

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

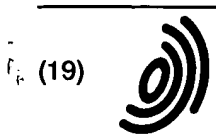
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
 - TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
 - FADED TEXT
 - ILLEGIBLE TEXT
 - SKEWED/SLANTED IMAGES
 - COLORED PHOTOS
 - BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
 - GRAY SCALE DOCUMENTS
-

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 710 667 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
10.09.1997 Patentblatt 1997/37

(51) Int. Cl.⁶: **C07H 21/00**, C07H 19/14,
A61K 31/70

(43) Veröffentlichungstag A2:
08.05.1996 Patentblatt 1996/19

(21) Anmeldenummer: **95117058.8**

(22) Anmeldetag: **30.10.1995**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE

(30) Priorität: **04.11.1994 DE 4438918**

(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
65929 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:
• **Seela, Frank Prof. Dr.**
D-49076 Osnabrück (DE)
• **Thomas, Horst, Dr.**
D-27801 Dötlingen/Neerstedt (DE)

(54) **Modifizierte Oligonukleotide, deren Herstellung sowie deren Verwendung**

(57) Die Erfindung betrifft neue modifizierte Oligonucleotide, die mindestens eine substituierte 7-Desazapurinbase aufweise und stabilere Hybridisierungs-komplexe mit Nukleinsäuren bilden;
Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung als Inhibitoren der Genexpression, als Sonden zum Nachweis von Nukleinsäuren, als Hilfsmittel in der Molekularbiologie und als Arzneimittel oder Diagnostikum.

EP 0 710 667 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 11 7058

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	WO 93 12130 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24.Juni 1993 * Ansprüche 1,7; Abbildung 1 *	1-15,18	C07H21/00 C07H19/14 A61K31/70
D,X	WO 94 24144 A (GILEAD SCIENCES INC ; FROEHLER BRIAN (US); MATTEUCCI MARK (US)) 27.Oktober 1994 * das ganze Dokument *	1-15,18	
D,X	WO 94 22892 A (STERLING WINTHROP INC) 13.Oktober 1994 * das ganze Dokument *	1-15,18	
D,X	WO 93 09127 A (GILEAD SCIENCES INC) 13.Mai 1993 * das ganze Dokument *	1-15	
A	BIOORG. MED. CHEM. LETT., Bd. 4, Nr. 8, 1994, Seiten 971-6, XP002021199 F. SEELA: "3-Deaza and 7-Deazapurines: Duplex Stability of Oligonucleotides Containing Modified Adenine and Guanine Bases" * das ganze Dokument *	1-15	
P,X	NUCLEIC ACIDS SYMP. SER., 9.November 1994, Seiten 151-2, XP002021200 F. SEELA: "Oligonucleotides with Unnatural Bases or an Altered Sugar-Phosphate Backbone" * das ganze Dokument *	1-15	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			C07H A61K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 8.Juli 1997	Prüfer Bardili, W
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 11 7058

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	NUCLEIC ACIDS RES., Bd. 20, 1992, Seiten 4831-7, XP002021270 K.J. LIVAK ET AL.: "Detection of Single Base Differences Using Biotinylated Nucleotides With Very Long Linker Arms" * Zusammenfassung; Abbildung 1 *	1-7, 16-19	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, no. 21, 1983 Columbus, Ohio, US; abstract no. 175428, B.G. HUGHES ET AL.: "2',5'-Oligoadenylates and Related 2',5'-Oligonucleotide Analogs" Seite 322; XP002021271 * Zusammenfassung * & BIOCHEMISTRY, Bd. 22, 1983, Seiten 2116-26,	1-7	
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 23, 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 314367, F. SEELA ET AL.: "Duplex Stabilization of DNA" Seite 946; XP002021272 * Zusammenfassung * & HELV. CHIM. ACTA, Bd. 78, Nr. 1, 1995, Seiten 94-108,	1-15,18	
X	EP 0 252 683 A (DU PONT) 13.Januar 1988 * das ganze Dokument *	19	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 8.Juli 1997	Prüfer Bardili, W
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 11 7058

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	J. MED. CHEM., Bd. 28, 1985, Seiten 1461-7, XP000655163 H.B. COTTAM ET AL.: "Synthesis and Biological Activity of Certain 6-Substituted and 2,6-Disubstituted 2'-Deoxytubercidins" * Tabelle 1 *	18	
X	--- NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES, Bd. 8, 1989, Seiten 587-97, XP000655157 F. SEELA ET AL.: "Assignment of Anomeric Configuration of D-Ribo-, Arabino-, 2'-Deoxyribo-, and 2',3'-Dideoxyribonucleosides by NOE Difference Spectroscopy" * Seite 588 - Seite 589 *	18	
D,X	--- HELV. CHIM. ACTA, Bd. 77, Nr. 4, 1994, Seiten 897-903, XP000655155 F. SEELA UND H. THOMAS: "84. Synthesis of Certain 5-Substituted 2'-Deoxytubercidin Derivatives" * das ganze Dokument *	18	
X	--- J. HETEROCYCLIC CHEM., Bd. 27, 1990, Seiten 2069-75, XP000655185 K. EGER AT AL.: "Synthesis of Pyrrolo(2,3-d)pyrimidine Ribosides and thei Potential in Chemotherapeutics" Verbindungen 29 and 30 * Seite 2070 *	18	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 8. Juli 1997	Prüfer Bardili, W
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 11 7058

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
P,X	HELV. CHIM. ACTA, Bd. 78, 1995, Seiten 1083-90, XP000655172 F. SEELA ET AL.: "88. 7-Substituted 7-Deaza-2'-deoxyguanosines" * das ganze Dokument *	18	
X	EP 0 251 786 A (DU PONT) 7.Januar 1988 * das ganze Dokument *	19	
P,X	WO 95 04747 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 9.Februar 1995 * Seite 5 *	16-19	
X	EP 0 286 028 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 12.Oktober 1988 * Anspruch 1 *	16-19	
X	DE 35 29 478 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 19.Februar 1987 * das ganze Dokument *	19	
X	WO 92 06219 A (APPLIED BIOSYSTEMS) 16.April 1992 * Anspruch 7 *	19	
X	SCIENCE, Bd. 238, 1987, Seiten 336-341, XP000604017 J.M. PROBER ET AL.: "A System for Rapid DNA Sequencing with Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides" * das ganze Dokument *	19	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 8.Juli 1997	Prüfer Bardili, W
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 11 7058

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 047 & JP 63 241356 A (SEKISUI CHEM CO LTD), 6.Oktober 1988, * Zusammenfassung *	16,17,19	
X	LIEB. ANN. CHEM., 1984, Seiten 708-21, XP000652359 F. SEELA UND H. WINKLER: "Synthese und Furanosid/ Pyranosid-Isomerisierung von 7-Desaza-2'-desoxy-7-methylguanosin" * Seite 710 *	18	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchemort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 8.Juli 1997	Prüfer Bardili, W
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	



Europäisches
Patentamt

GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthält bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Alle Anspruchsgebühren wurden innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden.
- namlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen.

namlich:

siehe Seite -B-

- ☒ Alle weiteren Recherchegebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchegebühren entrichtet worden sind.
- namlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen.
- namlich Patentansprüche



Europäisches
Patentamt

MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

EP 95 117 058.8

Die vorliegende Anmeldung umfaßt 2 Komplexe von Erfindungen:

Die in den Ansprüchen 1 bis 15 beschriebene Erfindung, nämlich synthetische Oligonukleotide, die bestimmte 7- (oder 8-) substituierte 7-Desazanukleotidanaloga enthalten, sowie deren Herstellung und Verwendung als Arzneimittel und Diagnostika.

Die Erfindung der Ansprüche 16 bis 19, d.h. 7- oder 8-substituierte 7-Desazapurinnukleotide sowie deren Verwendung zur Sequenzierung von DNA.

Der Anwendungsbereich der Oligonukleotide nach Anspruch 1 einerseits und der Nukleotide nach Anspruch 16 andererseits ist ganz unterschiedlich und kann die Einheitlichkeit der beiden Erfindungskomplexe nicht begründen. Ferner ist ein gemeinsames, besonderes Strukturmerkmal der beiden Erfindungen, das Einheitlichkeit begründen könnte, nicht ersichtlich. Gemeinsam ist bei den Erfindungen lediglich, daß 7- (oder 8-) substituierte 7-Desazapurinnukleotidbausteine auf unterschiedlichen bekannten Anwendungsgebieten eingesetzt werden. Diese Idee ist dem Stand der Technik aber bereits entnehmbar wie ein Blick auf die Dokumente des Recherchenberichtes lehrt, vgl. z.B. WO-A-94 24 144 und EP-A-0 252 683 oder Nucleic Acids Res. 20, 4381-7 (1992).

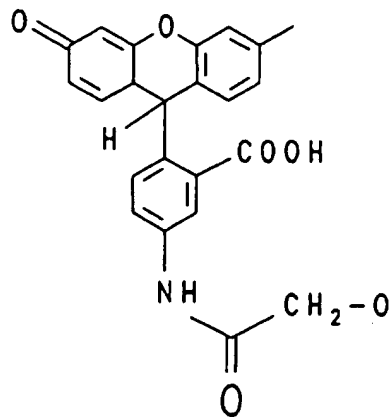
über die 7-Stellung des 7-Desazapurins Biotin- bzw. Iminobiotinreste über eine spezielle Verbindungsgruppe konjugiert sind, sind aus EP 63 879 bekannt.

Unter Markierungs-Gruppen für eine DNA- oder RNA-Sonde sind fluoreszierende Gruppen beispielsweise von Dansyl- (=N-Dimethyl-1-aminonaphthyl-5-sulfonyl-), Fluorescein- oder Coumarin-Derivaten oder chemilumineszierende Gruppen beispielsweise von Acridin-Derivaten zu verstehen sowie das über ELISA nachweisbare Digoxigenin-System oder die über das Biotin/Avidin-System nachweisbare Biotin-Gruppe sowie die unter g) bereits aufgeführte Interkalatoren und chemisch aktive Gruppen (siehe auch Beaucage et al., Tetrah. (1993) Vol 49, No. 10, 1925-1963).

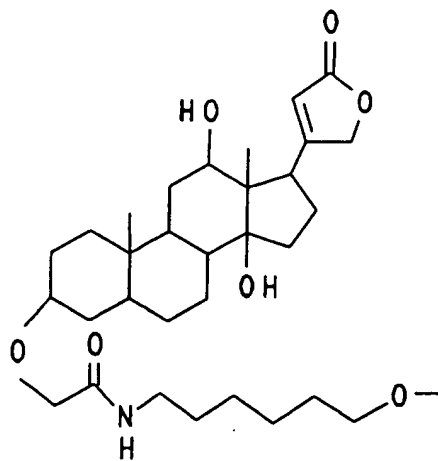
Beispielhaft für Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, sind Steroid-Reste wie Cholesteryl oder Vitamin-Reste wie Vitamin E, Vitamin A oder Vitamin D und andere Konjugate, die natürliche Carriersysteme ausnutzen wie Gallensäure, Folsäure, 2-(N-Alkyl, N-Alkoxy)-Aminoanthrachinon und Konjugate der Mannose und Peptide der entsprechenden Rezeptoren, die zur rezeptorvermittelten Endozytose der Oligonucleotide führen wie EGF (Epidermal Growth Factor), Bradykinin und PDGF (Platelet Derived Growth Factor).

Allgemein können die beschriebenen Gruppen sowohl auf der Ebene der Oligonukleotide (beispielsweise über SH-Gruppen) als auch auf der Ebene der Monomeren (Phosphonate, Phosphoamidite oder Triphosphate) eingeführt werden. Bei den Monomeren, insbesondere bei den Triphosphaten, ist es vorteilhaft, die Seitenketten, an die eine Reporter- oder Interkalatorgruppe eingeführt werden soll, geschützt zu lassen, und erst nach der Phosphorylierung die Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten und mit einem gegebenenfalls aktivierten Derivat der entsprechenden Reporter- oder Interkalatorgruppe umzusetzen.

Typische Markierungsgruppen sind:



Fluorescein-Derivat



Digoxigeninkonjugat

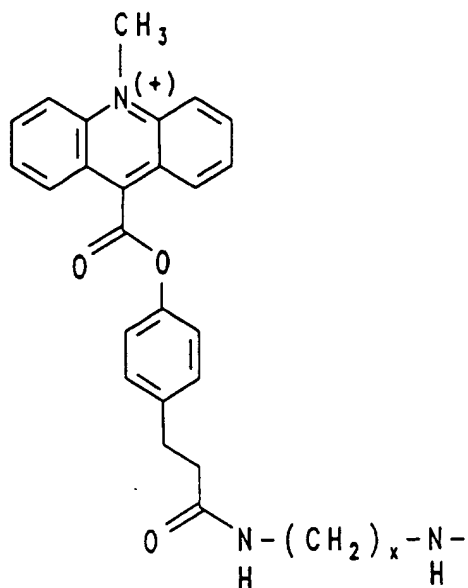
Oligonucleotidanaloga, die an Nucleinsäuren binden bzw. interkalieren und/oder spalten oder quervernetzen, enthalten z.B. Acridin-, Psoralen-, Phenanthridin, Naphtochinon-, Daunomycin- oder Chlorethylaminoaryl-Konjugate. Typische interkalierende und quervernetzende Reste sind:

5

10

15

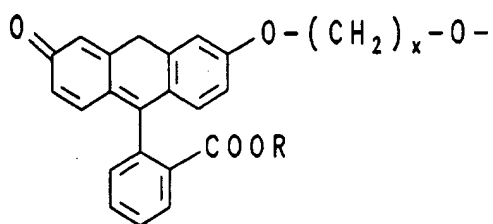
20



Acridinium-Ester

25

30



x = 2-18 bevorzugt 4

R = H oder C₁-C₄-Alkyl(= "Fluorescein" fuer x = 4 und R = CH₃)

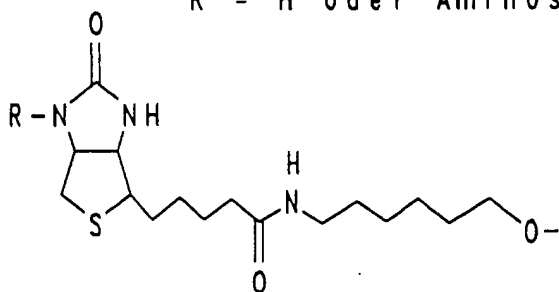
Fluorescein-Derivat

35

R = H oder Aminoschutzgruppe

40

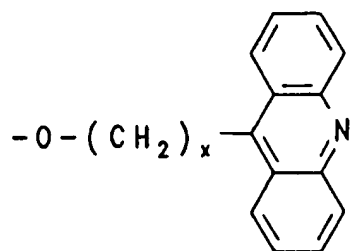
45



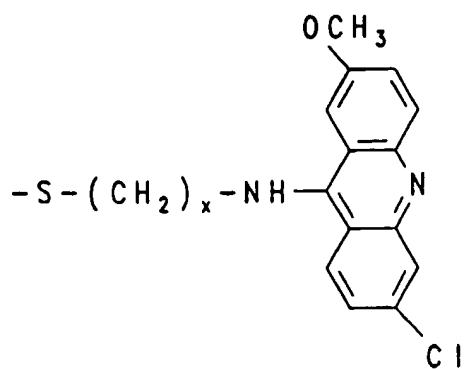
50

Biotinkonjugat (= "Biotin" fuer R = Fmoc)

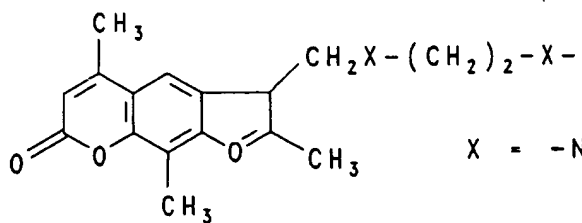
55



Acridinderivat $x = 2-12$, bevorzugt 4



$x = 2-12$, bevorzugt 4



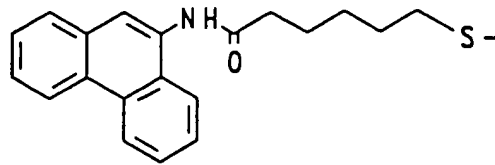
$X = -NH$ oder $-O-$

Trimethylpsoralen-konjugat (= "Psoralen" fuer $X = O$)

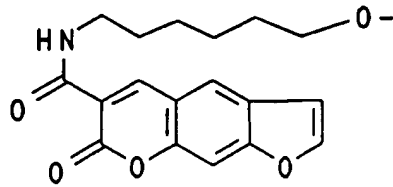
45

50

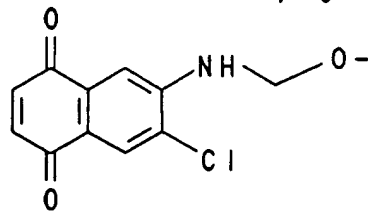
55



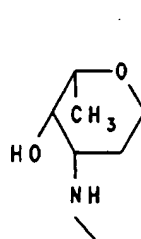
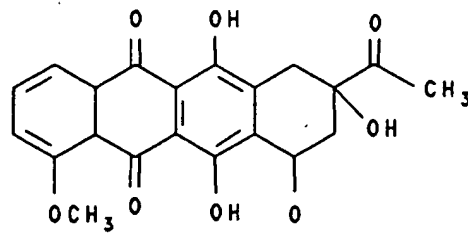
Phenanthrolinkonjugat



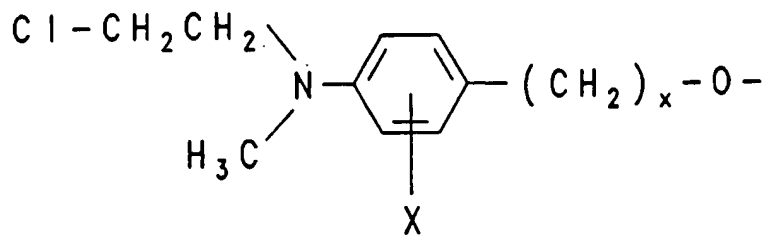
Psoralenkonjugat



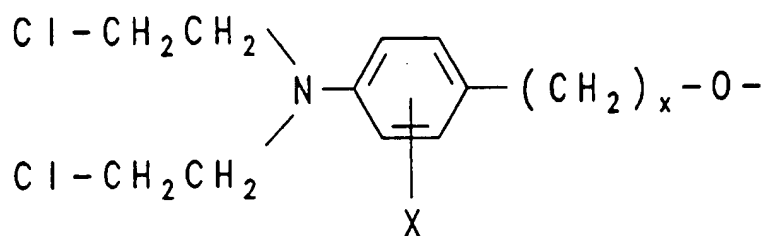
Napthhochinonkonjugat



Daunomycinderivat

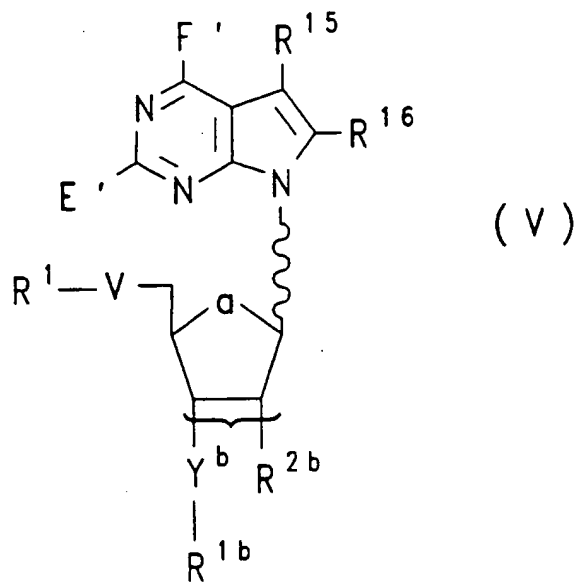


$x = 1-18$, $X = \text{Alkyl, Halogen, NO}_2, \text{CN, } \begin{array}{c} -\text{C}-\text{R} \\ || \\ \text{O} \end{array}$



$x = 1-18$, $X = \text{Alkyl, Halogen, NO}_2, \text{CN, } \begin{array}{c} -\text{C}-\text{R} \\ || \\ \text{O} \end{array}$

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verbindung der Formel V



worin

V Oxy, Sulfandiyl oder Imino ist;

Y^b Oxy, Sulfandiyl, Imino oder Methylen ist;

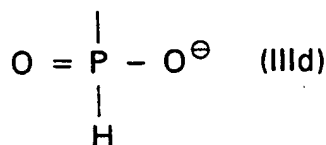
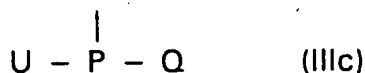
a für Oxy, Sulfandiyl oder Methylen steht;

R^{2b} Wasserstoff, OR¹², C₁-C₁₈-Alkoxy, C₁-C₆-Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, Halogen, Azido oder NR¹⁰R¹¹ bedeutet;

R¹ eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe bedeutet;

R^{1b} ein Succinylrest ist, der über eine Amid- oder Methylimidbindung mit einem amino- oder methylaminofunktionalisierten Träger verknüpft ist, oder

einen Rest der Formel IIIc oder IIIId bedeutet



worin

U (C₁-C₁₈)-Alkoxy, (C₁-C₁₈)-Alkyl, (C₆-C₂₀)-Aryl, (C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₈)-Alkyl, O-R⁷, S-R⁷ oder einen Rest der Formel IV

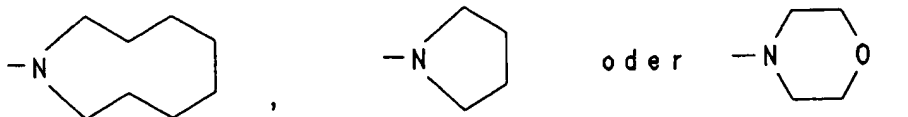


worin R⁵ gleich H ist, bedeutet;

Q einen Rest -NR⁸R⁹ bedeutet

R⁷ -(CH₂)₂-CN bedeutet;

R⁸ und R⁹ gleich oder verschieden sind und C₁-C₆-Alkyl, insbesondere Isopropyl oder Ethyl bedeuten oder zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-9-gliedrigen heterozyklischen Ring bedeuten, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann, insbesondere



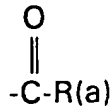
E' und F' unabhängig voneinander H, OR¹², NR¹⁰R¹¹ bedeuten, gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine in der Nukleotidchemie übliche Aminoschutzgruppe bedeuten oder R¹⁰ und R¹¹ gemeinsam eine in der Nukleotidchemie übliche Aminoschutzgruppe bilden,

R¹² Wasserstoff oder eine in der Nukleotidchemie übliche Hydroxylschutzgruppe, wie beispielsweise t-Butyldimethyl-silyl, Dimethoxytriphenylmethyl (DMT), Triisopropyl-silyl, o-nitro-Benzyl, p-nitro-Benzyl, iBu, 2-Fluorphenyl-4-methoxypiperidin-4-yl (FPMP), oder Methyl bedeutet,

R¹⁵ und R¹⁶ unabhängig voneinander

1. Wasserstoff
2. Halogen,
3. (C₁-C₁₀)-Alkyl,
4. (C₂-C₁₀)-Alkenyl,
5. (C₂-C₁₀)-Alkynyl,
6. NO₂,

7. NH_2 ,
8. Cyano,
9. $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkyl}$,
10. $(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkoxy}$
11. $(\text{C}_6-\text{C}_{20})\text{-Aryloxy}$
12. SiH_3 ,
- 13.



14. einen wie unter 3., 4., oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, $\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkyl}$, $(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkoxy}$, OH, $-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{d})$, $-\text{CO}-\text{R}(\text{b})$, $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{d})$, $-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{g})$, $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{f})$, $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{g})$ oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel

$-\text{O}-(\text{CH}_2)_r\text{S}-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{d})$, wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1-18, bevorzugt 1-6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, $-\text{CO}-\text{R}(\text{b})$, $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{d})$, $-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{d})$, $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{f})$, $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{g})$ oder $-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{g})$ eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe tragen oder mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder

15. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet.

- R(a) OH, $(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkoxy}$, $(\text{C}_6-\text{C}_{20})\text{-Aryloxy}$, NH_2 oder $\text{NH}-\text{T}$ bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft ist, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,
- R(b) Hydroxyl, $(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkoxy}$, oder $-\text{N}(\text{R}(\text{c})\text{R}(\text{d}))$ bedeutet,
- R(c) und R(d) unabhängig voneinander H, $(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkyl}$ unsubstituiert oder substituiert mit $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{f})$ oder $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{g})$ bedeuten,
- R(e) und R(f) unabhängig voneinander H oder $(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkyl}$ bedeuten,
- R(g) $(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkyl}-\text{COOH}$ bedeutet mit der Maßgabe, daß R^{15} und R^{16} nicht jeweils gleichzeitig Wasserstoff, NO_2 , NH_2 , Cyano oder SiH_3 sein können,

wobei funktionelle Gruppen wie OH, NH_2 oder COOH gegebenenfalls mit einer in der Nukleotidchemie üblichen Schutzgruppe geschützt sind,

die geschweifte Klammer andeutet, daß sich R^{2b} und der benachbarte $-\text{Y}^b-\text{R}^{1b}$ -Rest in 2'- und 3'-Stellung oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-Stellung befinden können,

Eine bevorzugte Ausführungsform stellen Verbindungen der Formel (V) dar, in denen V, Y^b und a für Oxy stehen, R^{2b} Wasserstoff oder OR^{12} , insbesondere Wasserstoff und R^{1b} einen Rest der Formel (IIlc) oder (IIld) bedeutet, wobei U $\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CN}$ bedeutet und R^8 und R^9 gleich oder verschieden sind und Isopropyl oder Ethyl bedeuten, oder zusammen mit dem sie tragenden N-Atom einen aliphatischen Heterocyclus, bevorzugt Pyrrolidino, bilden.

Ganz besonders bevorzugt sind diese, falls sich zusätzlich die Base am Zucker in β -Stellung und R^{2b} in 2'-Stellung befindet.

Bevorzugt sind auch Verbindungen der Formel (V), in denen E gleich $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ und F gleich H ist und ganz allgemein solche Verbindungen der Formel (V), die für die Herstellung bevorzugte Oligonukleotide der Formel I eingesetzt werden können.

Bevorzugte Aminoschutzgruppen sind beispielsweise Acyl- oder Amidin-Schutzgruppen.

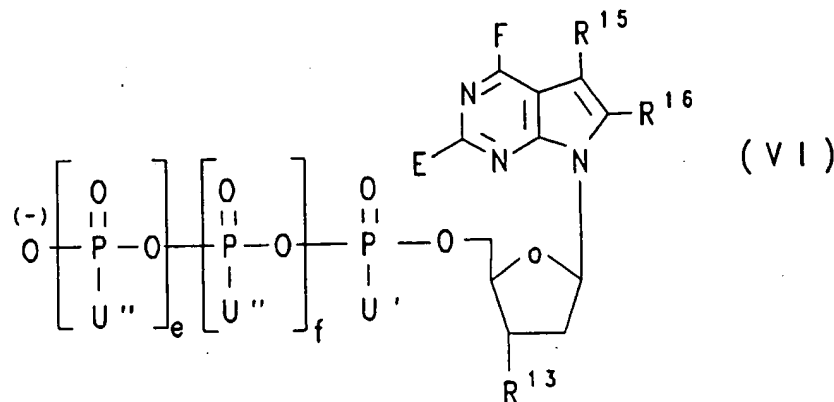
Unter dem üblicherweise als Salz vorliegenden Rest der Formel (IIld) sind anorganische oder organische Salze, beispielsweise Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalze, die z.B. in Remington's Pharmaceutical Sciences (17. Auflage,

Seite 1418 (1985) beschrieben sind, zu verstehen. Beispielhaft seien Triethylammonium- und Pyridiniumsalze genannt. Die Erfindung umfaßt aber auch Verbindungen der allgemeinen Formel (V), in denen der Rest der Formel (III d) als freie Säure vorliegt.

Die Verbindungen der Formel V können als Bausteine für die Herstellung der erfindungsgemäßen Oligonukleotide der Formel I eingesetzt werden.

Aus EP 251 786 sind 7-Desazapurin-Nukleotide, bzw. deren Mono-, Di- oder Triphosphate bekannt, die eine Alkylaminogruppe an der 7-Purin Position aufweisen. Die Alkylaminogruppe dient als "Linker", über den fluoreszierende Markermoleküle an das Nukleotid angekoppelt werden können. Die mit einem Fluoreszenzmarker versehenen Didesoxynukleotide können dann als Kettenabbruchmoleküle ("chain terminatoren") für die Didesoxysequenzierung nach Sanger verwendet und direkt fluoreszenzspektroskopisch detektiert werden. 7-Desazapurinnukleotide, die einen detektierbaren Rest am 7-Desazapurin tragen, sind aus U.S. 5,241,060 bekannt.

Die Erfindung betrifft auch Verbindungen der Formel VI



worin unabhängig voneinander

U' = U'' = U'''

e und f

R¹³

E und F

R¹⁵ und R¹⁶

gleich Hydroxyl oder Mercapto ist und U' zusätzlich BH₃ sein kann,

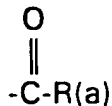
0 oder 1 bedeuten;

Wasserstoff, OH, C₁-C₁₈-Alkoxy, C₁-C₆-Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, bedeutet;

unabhängig voneinander H, OH oder NH₂ bedeuten; und

unabhängig voneinander

1. Wasserstoff
2. Halogen,
3. (C₁-C₁₀)-Alkyl,
4. (C₂-C₁₀)-Alkenyl,
5. (C₂-C₁₀)-Alkynyl,
6. NO₂,
7. NH₂,
8. Cyano,
9. -S-(C₁-C₆)-Alkyl,
10. (C₁-C₆)-Alkoxy
11. (C₆-C₂₀)-Aryloxy
12. SiH₃,
- 13.



14. einen wie unter 3., 4., oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, S-(C₁-C₆)-Alkyl, (C₁-C₆)-Alkoxy, OH, -NR(c)R(d), -CO-R(b), -NH-CO-NR(c)R(d), -NR(c)R(g), -NR(e)R(f), -NR(e)R(g) oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel

-[O-(CH₂)_r]_s-NR(c)R(d), wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1-18, bevorzugt 1-6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, -CO-R(b), -NH-CO-NR(c)R(d), -NR(c)R(d), -NR(e)R(f), -NR(e)R(g) oder -NR(c)R(g) zusätzlich mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder

15. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet.

- 15 R(a) OH, (C₁-C₆)-Alkoxy, (C₆-C₂₀)-Aryloxy, NH₂ oder NH-T bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft ist, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,
- 20 R(b) Hydroxyl, (C₁-C₆)-Alkoxy, oder -N(R(c)R(d)) bedeutet,
- R(c) und R(d) unabhängig voneinander H, (C₁-C₆)-Alkyl unsubstituiert oder substituiert mit -NR(e)R(f) oder -NR(e)R(g) bedeuten,
- R(e) und R(f) unabhängig voneinander H oder (C₁-C₆)-Alkyl bedeuten,
- R(g) (C₁-C₆)-Alkyl-COOH bedeutet
- 25 mit der Maßgabe, daß R¹⁵ und R¹⁶ nicht jeweils gleichzeitig Wasserstoff, NO₂, NH₂, Cyano oder SiH₃ sein können,

wobei Verbindungen der Formel VI ausgenommen sind in denen R¹⁶ gleich H ist und R¹⁵ (C₂-C₁₀)-Alkynyl, substituiert mit -NR(c)R(d) oder -NR(e)R(f) bedeutet; und der weiteren Maßgabe, daß e und f nicht 0 sind, wenn E = OH oder NH₂ und F = OH ist, R¹⁶ Wasserstoff ist und R¹⁵ Br, Cl, F, Cyano, (C₁-C₄)-Alkyl, (C₂-C₄)-Alkenyl oder (C₂-C₄)-Alkynyl bedeutet.

Die Erfindung umfaßt auch Verbindungen der allgemeinen Formel VI, die in allgemein üblicher Weise mit einem radioaktiver Markierung versehen sind (z.B. αP-Atom ist gleich ³²P; U ist gleich ³⁵S).

Bevorzugt sind Verbindungen der Formel VI in denen U' Hydroxyl oder Mercapto bedeutet, U'' = U''' Hydroxyl bedeutet und e und/oder f gleich 1 ist.

35 Besonders bevorzugt sind die Verbindungen der Formel VI, wenn e und f gleich 1 ist.

Die üblicherweise als Salz vorliegende Verbindungen der Formel VI umfassen anorganische oder organische Salze, beispielsweise Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalze [Remington's Pharmaceutical Sciences (17. Auflage, Seite 1418 (1985)). Beispielshaft seien Triethylammonium und Pyridiniumsalze genannt.

Die erfindungsgemäßen Verbindung VI umfassen auch solche Verbindungen, in denen die Phosphatgruppe als freie Säure vorliegt.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel VI können allgemein als Hilfsmittel in der Molekularbiologie eingesetzt werden, beispielsweise in PCR-Reaktionen (e=f=1, R¹³=OH) oder zum Sequenzieren (e=f=1; R¹³=H oder OH). Verbindungen der Formel VI sind besonders geeignet in PCR-Reaktionen, wenn R¹⁶=H und R¹⁵=Halogen ist.

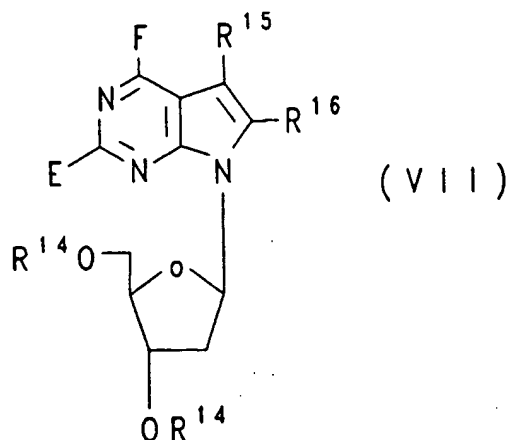
Die Verwendung der erfindungsgemäßen 7-Desazapurinnucleotide für die Sequenzierung von Nucleinsäuren ist aus mehreren Gründen vorteilhaft. So wird bei der Sequenzierungsmethode nach Sanger (Dideoxytechnik) die für GC-reiche Nukleotidbereiche oft zu beobachtende Kompression der Banden, die eine korrekte Bestimmung der Nukleotidsequenz erschwert, eliminiert oder zumindest verringert. Zusätzlich werden die während der Sequenzierung durch DNA- bzw. RNA-Polymerasen synthetisierten doppelsträngigen Nucleinsäuren durch den Einbau 7-, 8- oder 7,8-substituierter 7-Desazapurinbasen stabilisiert. Die Verwendung substituierter 7-Desazapurinnucleotide ist somit gegenüber der Verwendung von unsubstituierten 7-Desazaguanosinnucleotiden, die üblicherweise bei der Nucleinsäuresequenzierung zur Eliminierung von Bandenkompressionen GC-reicher DNA-Abschnitte eingesetzt werden (EP 212536), von Vorteil. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung substituierter 7-Desazapurinnucleotide bei der Sequenzierung ist, daß sich an den Substituenten in einer Reihe von Folgereaktionen fluoreszierende Reste in Form von Reportergruppen einführen lassen, die die fluoreszenzspektroskopische Detektion der während der Sequenzierungsreaktion synthetisierten Nucleinsäuremoleküle ermöglicht.

Des weiteren ermöglicht der Einbau von eigenfluoreszierenden, substituierten 7-Desazapurinbasen in Oligonucleotide, diese direkt über die Eigenfluoreszenz der substituierten 7-Desazapurinbasen nachzuweisen. So werden z.B. die in unsubstituierter Form nicht fluoreszierenden 7-Desazapurinbasen fluoreszierend, wenn an die 7-Position eine Alkynyl-

gruppe, z.B. Hexinyl eingeführt wird. Die Eigenfluoreszenz dieser Verbindungen lässt sich nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm (Excitation) bei 350 nm (Emission) messen.

Die Darstellung der Verbindungen der Formel VI ist ausgehend von den entsprechenden substituierten 7-Desazapurin-Nucleosiden möglich und erfolgt nach allgemein bekannten Methoden. Bevorzugt können die Verbindungen der Formel VI nach einem verkürzten Eintopfverfahren von Ludwig in Gegenwart von 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin und Trimethylphosphat hergestellt werden [J. Ludwig et al., (1981) Acta Biochem. Biophys. Sci. Hung., 16, 131].

Die Erfindung betrifft auch Verbindungen der allgemeinen Formel VII



worin

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| E und F | unabhängig voneinander H, OH oder NH ₂ bedeuten und OH und NH ₂ gegebenenfalls mit einer in der Nukleotidchemie üblichen Schutzgruppe geschützt sind; |
| R ¹⁵ und R ¹⁶ | unabhängig voneinander Wasserstoff, (C ₁ -C ₁₀)-Alkyl, (C ₂ -C ₁₀)-Alkenyl, (C ₂ -C ₁₀)-Alkynyl, J, Cl, Br, F, Cyano oder (C ₁ -C ₁₀)-Alkyl, (C ₂ -C ₁₀)-Alkenyl oder (C ₂ -C ₁₀)-Alkynyl, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeuten, wobei R ¹⁵ und R ¹⁶ nicht gleichzeitig Wasserstoff und Cyano sein können, und der weiteren Maßgabe, daß R ¹⁵ nicht J ist, wenn R ¹⁶ Wasserstoff, E NH ₂ und F OH bedeutet, |
| R ¹⁴ | unabhängig voneinander H oder eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe bedeutet. |

Die Erfindung umfaßt auch alle tautomeren Formen der Verbindungen der Formel I, V und VI, VII, insbesondere alle tautomeren Formen der 7-Desazapurinbasen der Formel II.

Ganz allgemein sind auch solche Verbindungen der Formel V, VI und VII bevorzugt, die als Ausgangs- bzw. Zwischenverbindungen für die Herstellung bevorzugter Oligonukleotide der Formel I verwendet werden können.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Oligonukleotide der Formel I.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen, substituierte 7-Desazapurine enthaltende Oligonukleotide können die in der chemischen Synthese von Oligonukleotiden üblichen Standardbedingungen angewandt werden.

Die Darstellung der erfindungsgemäßen Oligonukleotide der Formel I erfolgt in Lösung oder vorzugsweise an fester Phase, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme eines automatischen Synthesegeräts. Der Aufbau der Oligomere der Formel I kann schrittweise erfolgen, indem sukzessive eine Mononucleotid mit jeweils einer Nucleobase an einen entsprechend derivatisierten Träger oder an eine wachsende Oligomerkette ankondensiert werden.

Alternativ kann der Aufbau der Oligonukleotide der Formel I durch Zusammenfügen von Di- oder auch Trinukleotiden erfolgen [S. Beaucage et al, Tetrah. Vol. 48, No. 12, 2223-2311, (1992); und Tetrah. Vol. 48, No. 28, 6123-6194, (1993)]. Dies ist besonders bei der Synthese von Oligonukleotiden, die modifizierte Phosphatbrücken aufweisen, von Vorteil.

Der Aufbau des Oligonukleotide erfolgt nach den dem Fachmann bekannten Verfahren wie der Triester-Methode, der H-Phosphonat-Methode oder Phosphoramidit-Methode, [E. Sonveaux, (1986), Bioorganic Chemistry, 14, 274-325; S.L. Beaucage et al., (1992), Tetrathedron, 48, 2223-2311]. Zur Einführung der 7-Desazapurinderivate werden bevorzugt die Nukleotid-Monomerbausteine der Formel V, insbesondere bevorzugt die der Formel V in der E' gleich NR¹⁰R¹¹ und F' gleich OR¹² ist oder F' gleich NR¹⁰NR¹¹ ist und E' gleich H ist, eingesetzt.

Die Bereitstellung der Verbindungen der Formel V als Bausteine für die Oligonucleotid-Festphasensynthese kann ausgehend von den entsprechenden 7-Desazapurin-Nucleosiden erfolgen. Die Einführung von Substituenten an die 7-

Position des 7-Desazapurinringsystems ist nach allgemein bekannten Methoden möglich. Die Herstellung von an der 7-Position mit Halogen oder Methyl substituierten 7-Desazapurinnucleoside wird beispielsweise von Seela et al. [Helvetica Chimica Acta, (1994) 77, 897-903] beschrieben. Alkenyl- bzw. Alkynyl-substituierte 7-Desazapurinderivate der Formel V lassen sich ausgehend von dem bekannten 5-Jodtubercidin (= 7-J-7-Desazaadenosin, siehe Seela et al., supra) herstellen, indem mittels einer Kreuzkupplungsreaktion in Gegenwart von Tetrakis(triphenyl-phosphin)-palladium (O) Alkenyl- oder Alkynylgruppen an die 7-Position des 7-Desazapurinringssystems gekoppelt werden.

Elektrophile Substituenten (z.B. Halogene) können in die 8-Position des 7-Desazapurinringssystems eingeführt werden, wenn als Ausgangsverbindungen Nucleoside eingesetzt werden, die einen elektronenliefernden Substituenten (beispielsweise eine Aminogruppe) an der 2-Position des 7-Desazapurins aufweisen. Ist die 2-Aminogruppe beispielsweise acetyliert, so wird der elektrophile Substituent in die 7-Position dirigiert. Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur regioselektiven Einführung von elektrophilen Substituenten (beispielsweise Halogenen) in die 7- oder 8-Position von 7-Desazanucleosiden. Die halogenierten Nucleoside können dann als Ausgangsverbindung für die Einführung anderer Substituenten, beispielsweise von Alkyl, Alkenyl- oder Alkynylgruppen über die oben beschriebene palladiumkatalysierte Kreuzkupplungsreaktion, dienen. Alkoxy- oder substituierte Aminderivate können durch nukleophile Substitution, Nitrogruppen durch elektrophile Substitution eingeführt werden.

Im Falle von 7,8 bis-alkinylierten 7-Desazapurinen läßt sich durch Bergman-Reaktionen und auch photochemisch ein Diradikal erzeugen, bzw. ein weiteres Ringsystem annellieren [N. Turro et al., Tetrahedron Letters, 1994, Vol. 35, 8089]. Nach Einführung geeigneter Schutzgruppen für die Aminogruppen der 7-Desazapurinbasen sowie für die freie 5'-Hydroxylgruppe des Zuckers werden die Monomere in die entsprechenden Phosphonat- bzw. Phosphoramidit-Derivate übergeführt. Die Einführung geeigneter Aminoschutzgruppen, z.B. in Form einer Formamidin-Schutzgruppe ((Dimethylamino)methyliden) oder Acylschutzgruppen (z.B. Benzoyl oder Phenoxyacetyl) erfolgt nach allgemein bekannten Methoden [L.J. Mc Bride et al, (1983) Tetrahedron Lett., 24, 2953, G.S. Ti et al, (1982) J. Am. Chem. Soc., 104, 1316; H. Schaller et al. (1963), J. Am. Chem. Soc., 85, 3821], wobei im Falle der Acylierung der Aminogruppe die Anwendung der Peracylierungsmethode nach Schaller vorteilhaft ist. Eine geeignete Schutzgruppe für die freie 5'-OH-Gruppe des Zuckers ist z.B. 4,4'-Dimethoxytrityl, deren Einführung ebenfalls nach bekannten Methoden erfolgt [C.B. Reese (1978), Tetrahedron, 34, 3143; D. Flockerzi et al., (1981), Liebigs Ann. Chem., 1568]. Die solchermaßen geschützten Monomere können entsprechend einer Vorschrift von Froehler et al zu den entsprechenden Phosphonaten umgesetzt werden [B. C. Froehler et al., (1986), Nucl. Acid Res., 14, 5399]. Die Herstellung von Cyanoethyl-Phosphoramidit-Derivaten kann beispielsweise durch Umsetzung der Monomere mit Chlor- β -cyanoethoxy-(N,N-diisopropylamino)phosphan in wasserfreien Dichlormethan erfolgen [N. D. Sinha et al., (1984) Nucl. Acid Res., 12, 4539].

Die Synthese von Verbindungen der Formel I, deren Oligonucleotid-Teil am 3'- und/oder am 5'-Ende modifiziert ist, erfolgt bezüglich dieser Modifikationen nach den in EP-A 0 552 766 beschriebenen Verfahren.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen Oligonucleotide der Formel I zur Herstellung eines Arzneimittels sowie ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die erfindungsgemäßen Oligonucleotide mit einem physiologisch annehmbaren Träger sowie gegebenenfalls geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen vermischt.

Ganz generell erstreckt sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung von Oligonucleotiden der Formel I als therapeutisch wirksame Bestandteile eines Arzneimittels. Als therapeutisch wirksame Oligonucleotid-Derivate versteht man im allgemeinen Antisense Oligonucleotide, Tripelhelix-bildende-Oligonucleotide, Aptamere oder Ribozyme, insbesondere Antisense-Oligonucleotide.

Darüberhinaus ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung von Oligonucleotiden mit mindestens einem substituierten 7-Desazapurin, vorzugsweise 7-Desazaadenin oder 7-Desazaguanin, als Diagnostikum, beispielsweise zur Detektion der An- oder Abwesenheit oder der Menge eines spezifischen doppelsträngigen oder einzelsträngigen Nucleinsäuremoleküls in einer biologischen Probe.

Die Oligonucleotide haben für die erfindungsgemäße Verwendung eine Länge von 4 bis 100, vorzugsweise von ca. 5-40, insbesondere von ca. 6-30 Nucleotiden. Ansonsten gelten auch hier die oben beschriebenen Vorzugsbereiche, Modifikationen bzw. Konjugationen.

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung können beispielsweise zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden, beispielsweise durch HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder Papilloma Viren, verwendet werden.

Erfindungsgemäße Antisense Oligonucleotide-Derivate, also Antisense Oligonucleotide, in denen mindestens eine Purinbase durch eine substituierte 7-Desazapurinbase ersetzt ist, und die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basensequenzen:

a) gegen HIV, z.B.

5'-ACACCCAATTCTGAAAATGG-3' (I) oder
 5'-AGGTCCCTGTTCTGGGCGCCA-3' (II) oder
 5'-GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA-3' (III) oder

5'-GCTATGTCGACACCCCAATTCTGAAA-3' (IV) oder
 5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTGCCA (VI) oder

b) gegen HSV-1, z.B.

5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCG-3' (VII)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Behandlung von Krebs. Beispielsweise können dabei Oligonucleotid-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Krebsentstehung bzw. Krebswachstum verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

1) Nucleare Onkoproteine wie beispielsweise c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120

2) Cytoplasmische/Membran-assoziierte Onkoproteine wie beispielsweise EJ-ras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise EGF-Rezeptor, c-erbA, Retinoid-Rezeptoren, Protein-Kinase regulatorische Untereinheit, c-fms

4) Cytokine, Wachstumsfaktoren, Extrazelluläre Matrix wie beispielsweise CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, bFGF, Myeloblastin, Fibronectin.

Erfindungsgemäße Antisense-Oligonucleotide der Formel I, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) gegen c-Ha-ras, z.B.

5'-CAGCTGCAACCCAGC-3' (VIII)

c) c-myc, z.B.

5'-GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC-3' (IX)

5'-AACGTTGAGGGGCAT-3' (X)

d) c-myb, z.B.

5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3' (XI)

e) c-fos, z.B.

5'-GGAGAACATCATGGTCGAAAG-3' (XII)

5'-CCCGAGAACATCATGGTCGAAAG-3' (XIII)

5'-GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG-3' (XIV)

f) p120, z.B.

5'-CACCCGCCTTGGCCTCCCA-3' (XV)

g) EGF-Rezeptor, z.B.

5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3' (XVI)

5'-GGCAAACCTTTCTTTCTCTCC-3' (XVII)

h) p53 Tumorsuppressor, z.B.

5'-GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3' (XVIII)

5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3'r (XIX)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden, beispielsweise durch VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM oder ELAM.

Erfindungsgemäße Antisense-Oligonucleotid-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) VLA-4, z.B.

5'-GCAGTAAGCATCCATATC-3' (XX) oder

b) ICAM, z.B.

5'-CCCCCACCACCTTCCCCTCTC-3' (XXI)

5'-CTCCCCCACCACCTTCCCCTC-3' (XXII)

5'-GCTGGGAGCCATAGCGAGG-3' (XXIII)

c) ELAM-1, z.B.

5'-ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG-3' (XXIV)

5'-CAATCAATGACTTCAAGAGTTTC-3' (XXV)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Verhinderung der Restenose. Beispielsweise können dabei Oligonucleotid-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Proliferation oder Migration verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

1) Nucleare Transaktivator-Proteine und Cycline wie beispielsweise c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, Cycline und cdc2-Kinase

2) Mitogene oder Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF, bFGF, EGF, HB-EGF und TGF- β .

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise bFGF-Rezeptor, EGF-Rezeptor und PDGF-Rezeptor.

Erfindungsgemäße Oligonucleotide der Formel I, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) c-myb

5'-GTGTCGGGGTCTCCGGGC-3' (XXVI)

b) c-myc

5'-CAGTTGAGGGGCAT-3' (XXVII)

c) cdc2-Kinase

5'-GTCTTCCATAGTTACTCA-3' (XXVIII)

d) PCNA (proliferating cell nuclear antigen of rat)

5'-GATCAGGCGTGCCCTCAA-3' (XXIX)

Die Arzneimittel können z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten, die man oral, z.B. in Form von Tabletten, Dragees, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen verabreichen kann, verwendet werden. Der Einschluß der Arzneimittel in Liposomen, die gegebenenfalls weitere Komponenten wie Proteine enthalten, ist eine ebenfalls geeignete Applikationsform. Sie können auch rektal z.B. in Form von Suppositorien oder parenteral z.B. in Form von Injektionslösungen verabreicht werden. Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können diese Verbindungen in therapeutisch inerten organischen und anorganischen Trägern verarbeitet werden. Beispiele von solchen Trägern für Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln sind Laktose, Maisstärke oder Derivate davon, Talg und Stearinsäure oder Salze davon. Geeignete Träger für die Herstellung von Lösungen sind Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose. Geeignete Träger für Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerol und pflanzliche Öle. Geeignete Träger für Suppositorien sind pflanzliche und gehärtete Öle, Wachse, Fette und halbfüssige Polyole. Die pharmazeutischen Präparate können auch Konservierungsmittel, Lösemittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgatoren, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksmittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Überzugsmittel, Antioxidantien, sowie ggf. andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.

Bevorzugte Verabreichungsformen sind topische Applikationen, lokale Applikationen wie beispielsweise mit Hilfe eines Katheters oder aber auch Injektionen. Zur Injektion werden die Antisense-Oligonucleotid-derivate in einer flüssigen Lösung, vorzugsweise in einem physiologisch annehmbaren Puffer, wie z.B. Hank's Lösung oder Ringer's Lösung, formuliert. Die Antisense-Oligonucleotide können aber auch in fester Form formuliert werden und vor dem Gebrauch gelöst oder suspendiert werden. Die für die systemische Verabreichung bevorzugten Dosierungen betragen ca. 0,01 mg/kg bis ca. 50 mg/kg Körpergewicht und Tag.

Ganz generell erstreckt sich die Erfindung auf die Verwendung von Verbindungen der Formel I als DNA-Sonden oder Primer in der DNA-Diagnostik und allgemein als Hilfsmittel in der Molekularbiologie

Einzelne DNA-Moleküle können elektronenmikroskopisch, z.B. im Tunnelrastermikroskop, sichtbar gemacht werden. Während Pyrimidinbasen sich aufgrund der Methylgruppe an der 5-Position elektronenmikroskopisch unterscheiden lassen ist dies bei den Purinbasen Adenin und Guanin nicht möglich. Es ist daher nicht ohne weiteres möglich, die

Basensequenz von Nukleinsäurenmolekülen elektronenmikroskopisch zu entschlüsseln. Enthält das zu untersuchende Nukleinsäuremolekül nun aber z.B. substituierte 7-Desazaguaninderivate statt der unmodifizierten Guaninbasen, so lassen sich die substituierten 7-Desazaguaninbasen von unsubstituierten Adeninbasen im Elektronenmikroskop unterscheiden (und umgekehrt Guaninbasen von substituierten 7-Desazaadeninbasen). Die Basensequenz von Nukleinsäuren, die 7-substituierte 7-Desazapurinbasen enthalten, kann somit mit Hilfe der Elektronenmikroskopie entschlüsselt werden.

5

10

15

20

25

30

35

40

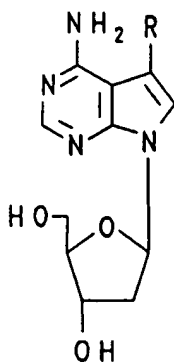
45

50

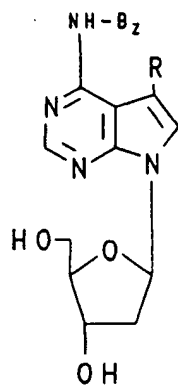
55

Beispiele:

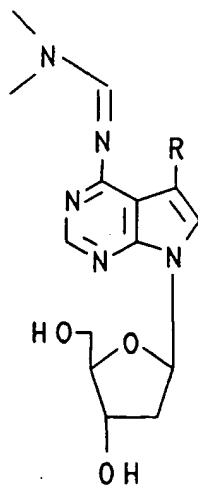
Die in den Beispielen genannten Verbindungen (1)-(25) weisen folgende Strukturformeln auf.



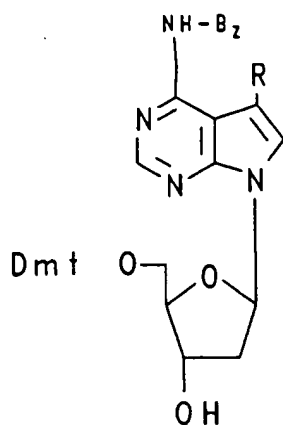
	R
(1)	C l
(2)	B r
(3)	C H ₃



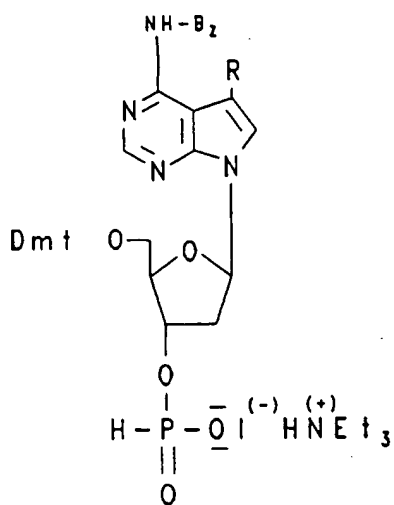
	R
(4)	C l
(5)	B r
(6)	C H ₃



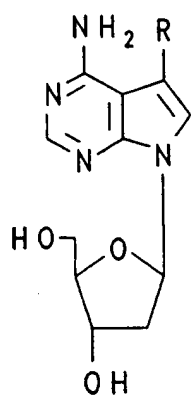
	R
(7)	B r



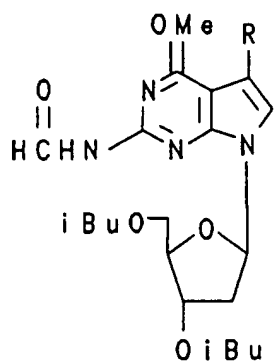
	R
(8)	Cl
(9)	Br
(10)	CH ₃



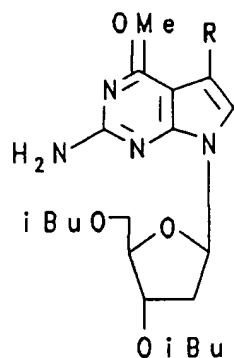
	R
(11)	Cl
(12)	Br
(13)	CH ₃
(15)	$-C \equiv C - CH_2 - NH - \overset{O}{\parallel} C - CF_3$
(16)	$-C \equiv C - (CH)_3 - NH - \overset{O}{\parallel} C - CF_3$



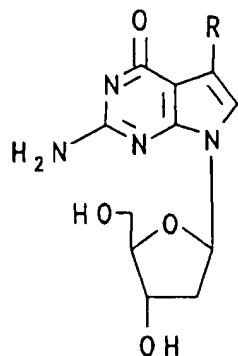
	R
(14)	J
(17)	$-HC \equiv CHCO_2Me$
(23)	$-C \equiv C - Si(Me)_3$
(24)	$-C \equiv CH$
(25)	$-C \equiv C - (CH_2)_3Me$



	R
(18)	H
(19)	Br



	R
(20)	Cl



	R
(21)	Br
(22)	Cl

Die Herstellung der Desoxytubercidin-derivate (1)-(3) (Tubercidin = 7-Desazaadenosin) erfolgt nach dem von Seela et al. [Helvetica Chimica Acta, 1994, 77, 897-903] beschriebenen Verfahren.

Bei Verwendung eines Tubercidin-derivats als Ausgangsverbindung können analog zu den folgenden Beispielen die entsprechenden Ribonukleosid-derivate hergestellt werden.

Beispiel 1:

4-Benzoylamino-5-chlor-7-(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (4)

1.14 g (4.0 mmol) 5-Chlordesoxytubercidin (1) werden zweimal mit trockenem Pyridin abgedampft, in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und anschließend mit 5.2 ml (40.6 mmol) Trimethylchlorsilan 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird mit 520 μl (4.1 mmol) frisch destilliertem Benzoylchlorid versetzt und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Unter Eiskühlung werden 4 ml Wasser und nach weiteren 5 min 8 ml 25%-iges wäßriges Ammoniak zugetropft. Der Ansatz wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird

in 20 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft und an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, Dichlormethan/ Methanol 9:1). Aus der langsamer wandernden Hauptfraktion erhält man nach Eindampfen des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Methanol/ Wasser 930 mg (2.4 mmol, 60%) der Verbindung (4) als farblose Kristalle: Schmp. 190°C.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9:1): $R_f = 0.4$.

UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 274 \text{ nm}$ (5300), 305 nm (5600).

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 2.31$ (m, 2' α -H), 2.57 (m, 2' β -H), 3.58 (m, 2H, 5'-H), 3.89 (m, 4'-H), 4.41 (m, 3'-H), 5.00 (t, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 5'-OH), 5.33 (d, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 3'-OH), 6.72 (pt, $J = 6.75 \text{ Hz}$, 1'-H), 7.44-7.65 (m, 3H, meta- und para- H_{Bz}), 8.00 (s, 6-H), 8.05 (d, 2H, ortho- H_{Bz}), 8.72 (s, 2-H), 11.2 (br, 4-NH).

$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_4$ (388.8)	Ber.	C 55.61	H 4.41	N 14.41
	Gef.	C 55.71	H 4.54	N 14.30

Beispiel 2:

4-Benzoylamino-5-brom-7-(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (5)

1.31 g (4.0 mmol) 5-Bromdesoxytubercidin (2) werden zweimal mit trockenem Pyridin abgedampft, in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und anschließend mit 5.2 ml (40.6 mmol) Trimethylchlorsilan 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird mit 520 μl (4.1 mmol) frisch destilliertem Benzoylchlorid versetzt und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Unter Eiskühlung werden 4 ml Wasser und nach weiteren 5 min 8 ml 25%-iges wäßriges Ammoniak zugetropft. Der Ansatz wird 30 min. bei Raumtemperatur gerührt und anschließend analog zu Verbindung 14b aufgearbeitet. Nach Chromatographie an Kieselgel (Säule 20 · 5 cm, Dichlormethan/ Methanol 9:1) erhält man nach Eindampfen des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Methanol/ Wasser 1.2 g (2.8 mmol, 70%) farblose Kristalle vom Schmp. 198°C.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9:1): $R_f = 0.4$.

UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 276 \text{ nm}$ (4600), 308 nm (4500).

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 2.27$ (m, 2' α -H), 2.50 (m, 2' β -H, überlagert von DMSO), 3.56 (m, 2H, 5'-H), 3.86 (m, 4'-H), 4.38 (m, 3'-H), 5.01 (t, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 5'-OH), 5.34 (d, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 3'-OH), 6.69 (pt, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 1'-H), 7.52-7.64 (m, 3H, meta- und para- H_{Bz}), 8.04 (d, 2H, ortho- H_{Bz}), 8.04 (s, 6-H), 8.72 (s, 2-H), 11.0 (br, 4-NH).

$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrN}_4\text{O}_4$ (433.3)	Ber.	C 49.90	H 3.96	N 12.93
	Gef.	C 50.04	H 4.10	N 13.05

Beispiel 3:

4-Benzoylamino-7-(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (6)

1.06 g (4.0 mmol) 5-Methyldesoxytubercidin (3) werden zweimal mit je 20 ml absolutem Pyridin nachgedampft, in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und mit 5.2 ml (40.6 mmol) Trimethylchlorsilan 2 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wird mit 520 μl (4.1 mmol) frisch destilliertem Benzoylchlorid versetzt und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog zu Verbindung (4), anschließend wird an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, Dichlormethan/ Methanol 9:1). Aus der langsamer wandernden Hauptfraktion erhält man nach Eindampfen des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Methanol/Wasser 1.1 g (2.9 mmol, 73%) farblose Kristalle (Verbindung 6) vom Schmp. 196°C.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9:1): $R_f = 0.3$.

UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 274 \text{ nm}$ (7050), 309 nm (5500).

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 2.09$ (m, 2' α -H), 2.21 (s, 5- CH_3), 2.50 (m, 2' β -H, überlagert von DMSO), 3.53 (m, 2H, 5'-H), 3.83 (m, 4'-H), 4.36 (m, 3'-H), 4.97 (t, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 5'-OH), 5.32 (d, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 3'-OH), 6.65 (pt, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 1'-H), 7.53 (s, 6-H), 7.53-7.66 (m, 3H, meta- und para- H_{Bz}), 8.05 (d, 2H, ortho- H_{Bz}), 8.60 (s, 2-H), 10.95 (br, 4-NH).

C ₁₉ H ₂₀ N ₄ O ₄ (368.4)	Ber.	C 61.95	H 5.47	N 15.21
	Gef.	C 62.08	H 5.65	N 15.00

5

10 Beispiel 4:

5-Brom-4-[(1-dimethylamino)methylen]amino-7-(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (7)

15 Zu einer Lösung von 200 mg (0.61 mmol) der Verbindung (2) in 15 ml Dimethylformamid gibt man 1.5 ml (8.75 mmol) N,N-Dimethylformamiddiethylacetal und läßt 2 h bei Raumtemperatur rühren. Anschließend engt man die Reaktionslösung bis zur Trockene ein und dampft den öligen Rückstand je zweimal mit Toluol und Aceton nach. Das Rohprodukt wird an Kieselgel adsorbiert und durch Säulenchromatographie gereinigt (Säule 20 · 5 cm, Dichlormethan/ Methanol 9:1). Nach Einengen der Hauptfraktion und Umkristallisation aus Aceton/ Methanol 9:1 erhält man Verbindung (7) als farblose Plättchen (150 mg, 0.4 mmol, 65%): Schmp. 177°C.

20 DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9:1): R_f = 0.65.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.20 (m, 2'α-H), 2.50 (m, 2'β-H, überlagert von DMSO), 3.18, 3.19 (2s, 2 N-CH₃), 3.54 (m, 2H, 5'-H), 3.86 (m, 4'-H), 4.35 (m, 3'-H), 5.01 (t, J = 5.5 Hz, 5'-OH), 5.26 (d, J = 5.0 Hz, 3'-OH), 6.57 (pt, J = 6.9 Hz, 1'-H), 7.70 (s, 6-H), 8.34 (s, 2-H), 8.82 (s, N=CH).

25

C ₁₄ H ₁₈ BrN ₅ O ₃ (384.2)	Ber.	C 43.77	H 4.72	N 18.23
	Gef.	C 43.92	H 4.80	N 18.11

30

Beispiel 5:

35 4-Benzoylamino-5-chlor-7-[(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (8)

500 mg (1.28 mmol) von Verbindung (4) werden zweimal mit trockenem Pyridin abgedampft und anschließend in 20 ml absolutem Pyridin gelöst. Man versetzt mit 650 mg (1.95 mmol) Dimethoxytritylchlorid und rührt 1 h bei Raumtemperatur. Der Ansatz wird mit 10 ml 5%-iger wäßriger NaHCO₃-Lösung hydrolysiert und zweimal mit je 25 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ wird an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, Dichlormethan/ Methanol 9:1). Der nach Eindampfen der Hauptzone erhaltene Rückstand liefert nach Abdampfen mit Aceton 680 mg (0.99 mmol, 77%) gelblichen Schaum. Zur Aufreinigung wird die Substanz in wenig Dichlormethan gelöst und langsam unter starkem Rühren in einen 200fachen Überschuß n-Hexan getropft. Verbindung (8) wird als weißer, amorpher Feststoff isoliert.

45 DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9:1): R_f = 0.5.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.30 (m, 2'α-H), 2.50 (m, 2'β-H, überlagert von DMSO), 3.15 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, 2 OCH₃), 3.98 (m, 4'-H), 4.42 (m, 3'-H), 5.40 (d, J = 5.0 Hz, 3'-OH), 6.69 (pt, J = 6.7 Hz, 1'-H), 6.84 (m, 4H, DMT), 7.2-7.8 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.87 (s, 6-H), 8.06 (d, 2H, ortho-H_{BZ}), 8.70 (s, 2-H), 11.0 (br, 4-NH).

50

C ₃₉ H ₃₅ ClN ₄ O ₆ (691.2)	Ber.	C 67.77	H 5.10	N 8.11
	Gef.	C 67.70	H 5.05	N 8.19

55

Beispiel 6:

4-Benzoylamino-5-brom-7-[(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin (9)

5

500 mg (1.15 mmol) von Verbindung (5) werden zweimal mit trockenem Pyridin abgedampft und anschließend in 20 ml absolutem Pyridin gelöst. Man versetzt mit 585 mg (1.75 mmol) Dimethoxytritylchlorid und rührt 1 h bei Raumtemperatur. Der Ansatz wird mit 10 ml 5 %-iger wäßriger NaHCO_3 -Lösung hydrolysiert und zweimal mit je 25 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 wird an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 \times 5 cm, Dichlormethan/ Methanol 9:1). Der nach Eindampfen der Hauptzone erhaltene Rückstand liefert nach Abdampfen mit Aceton 620 mg (0.93 mmol, 80%) gelblichen Schaum. Zur Aufreinigung wird die Substanz in wenig Dichlormethan gelöst und langsam unter starkem Rühren in einen 200fachen Überschuß n-Hexan getropft. Verbindung (9) fällt als weißer, amorpher Feststoff aus und wird abgesaugt.

10

DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9:1): $R_f = 0.55$.

15

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 2.30$ (m, 2' α -H), 2.50 (m, 2' β -H, überlagert von DMSO), 3.15 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, 2 OCH_3), 3.98 (m, 4'-H), 4.42 (m, 3'-H), 5.40 (d, $J = 5.0$ Hz, 3'-OH), 6.69 (pt, $J = 6.7$ Hz, 1'-H), 6.84 (m, 4H, DMT), 7.2-7.8 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.87 (s, 6-H), 8.06 (d, 2H, ortho- H_{Bz}), 8.70 (s, 2-H), 11.0 (br, 4-NH).

20

$\text{C}_{39}\text{H}_{35}\text{BrN}_4\text{O}_6$ (735.6)	Ber.	C 63.68	H 4.79	N 7.62
	Gef.	C 63.85	H 4.67	N 7.52

25

Beispiel 7:

4-Benzoylamino-7-[(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-5-methyl-7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin (10)

30

500 mg (1.36 mmol) von Verbindung (6) werden zweimal mit je 20 ml trockenem Pyridin abgedampft, in 20 ml absolutem Pyridin gelöst und mit 690 mg (2.1 mmol) Dimethoxytritylchlorid 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird analog zu Verbindung (8) aufgearbeitet und an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 \times 5 cm, Dichlormethan/ Methanol 9:1). Aus der Hauptzone erhält man 720 mg (1.05 mmol, 77%) der vollgeschützten Verbindung (10) als gelblichen Schaum. Die Aufreinigung durch Umfällen aus n-Hexan liefert einen farblosen, amorphen Feststoff.

35

DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9:1): $R_f = 0.5$.

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 2.08$ (s, 5- CH_3), 2.30 (m, 2' α -H), 2.50 (m, 2' β -H, überlagert von DMSO), 3.10 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, 2 OCH_3), 3.97 (m, 4'-H), 4.44 (m, 3'-H), 5.39 (d, $J = 5.0$ Hz, 3'-OH), 6.67 (pt, $J = 6.7$ Hz, 1'-H), 6.85 (m, 4H, DMT), 7.2-7.8 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.58 (s, 6-H), 8.06 (d, 2H, ortho- H_{Bz}), 8.60 (s, 2-H), 10.95 (br, 4-NH).

40

$\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6$ (670.8)	Ber.	C 71.63	H 5.71	N 8.35
	Gef.	C 71.48	H 5.71	N 8.36

45

Beispiel 8:

4-Benzoylamino-5-chlor-7-[(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin 3'-(Triethylammonium Phosphonat) (11)

50

Unter Argonatmosphäre wird zu einer Lösung von 315 μl (3.7 mmol) Phosphortrichlorid und 4.1 ml (37.0 mmol) N-Methylmorpholin in 40 ml absolutem Dichlormethan bei Raumtemperatur 840 mg (12.0 mmol) 1,2,4-1H-Triazol gegeben. Nach 30-minütigem Rühren wird auf 0°C gekühlt und innerhalb von 10 min eine Lösung von 500 mg (0.74 mmol) des vollgeschützten Nucleosids (8) in 10 ml trockenem Dichlormethan zugetropft. Man läßt weitere 10 min bei Raumtemperatur rühren und fügt anschließend 30 ml 1M Triethylammoniumbicarbonatpuffer (TBK, pH = 7.5) hinzu. Die Phasen

55

werden getrennt, die wäßrige Phase mehrmals mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der verbleibende Schaum an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, 0.5 l Dichlormethan/ Et_3N 98:2, danach Dichlormethan/ Methanol/ Et_3N 88:10:2). Nach Einengen der Hauptzone wird der Rückstand in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und fünfmal mit je 25 ml 0.1 M TBK-Puffer extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 und Abdampfen des Lösungsmittels erhält man 445 mg (0.52 mmol, 70%) des Phosphonats (11) als farblosen Schaum. Zur weiteren Aufreinigung wird dieser Schaum analog zum vollgeschützten Nucleosid (8) aus n-Hexan umgefällt.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9:1): $R_f = 0.6$.

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 1.16$ (t, 9H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$), 2.50 (m, 2' α -H, überlagert von DMSO), 2.74 (m, 2' β -H), 3.00 (q, 6H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$), 3.33 (m, 2H, 5'-H), 3.72 (s, 6H, 2 OCH_3), 4.15 (m, 4'-H), 4.78 (m, 3'-H), 6.66 (d, J = 585.8 Hz, P-H), 6.69 (pt, J = 7.8 Hz, 1'-H), 6.84 (m, 4H, DMT), 7.2-7.7 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.79 (s, 6-H), 8.04 (d, 2H, ortho- H_{Bz}), 8.69 (s, 2-H), 10.6 (br, 4-NH). $^{31}\text{P-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 1.16$ ppm (dd, $^1\text{J}(\text{PH}) = 588$ Hz, $^3\text{J}(\text{PH}) = 8.6$ Hz). $\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{ClN}_5\text{O}_8\text{P}$ (900.8)

Beispiel 9:

4-Benzoylamino-5-brom-7-[(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin 3'-(Triethylammonium Phosphonat) (12)

Unter Argonatmosphäre wird zu einer Lösung von 290 μl (3.4 mmol) Phosphortrichlorid und 3.8 ml (34.0 mmol) N-Methylmorpholin in 30 ml absolutem Dichlormethan bei Raumtemperatur 770 mg (11.0 mmol) 1,2,4-H-Triazol gegeben. Nach 30-minütigem Rühren wird auf 0°C gekühlt und innerhalb von 10 min eine Lösung von 500 mg (0.68 mmol) des vollgeschützten Nucleosids (9) in 10 ml trockenem Dichlormethan zugegeben. Man läßt weitere 10 min bei Raumtemperatur rühren und fügt anschließend 30 ml 1M Triethylammoniumbicarbonatpuffer (TBK, pH = 7.5) hinzu. Die Phasen werden getrennt, die wäßrige Phase mehrmals mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der verbleibende Schaum an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, 0.5 l Dichlormethan/ Et_3N 98:2, danach Dichlormethan/ Methanol/ Et_3N 88:10:2). Nach Einengen der Hauptzone wird der Rückstand in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und fünfmal mit je 25 ml 0.1 M TBK-Puffer extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 und Abdampfen des Lösungsmittels erhält man 410 mg (0.46 mmol, 67%) des Phosphonats (12) als farblosen Schaum. Zur weiteren Aufreinigung kann dieser Schaum analog zum vollgeschützten Nucleosid (9) aus n-Hexan umgefällt werden.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9:1): $R_f = 0.7$.

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 1.16$ (t, 9H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$), 2.50 (m, 2' α -H, überlagert von DMSO), 2.78 (m, 2' β -H), 3.00 (q, 6H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$), 3.22 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, 2 OCH_3), 4.17 (m, 4'-H), 4.82 (m, 3'-H), 6.68 (d, J = 588.5 Hz, P-H), 6.69 (pt, J = 6.7 Hz, 1'-H), 6.90 (m, 4H, DMT), 7.2-7.8 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.86 (s, 6-H), 8.07 (d, 2H, ortho- H_{Bz}), 8.70 (s, 2-H), 11.05 (br, 4-NH). $^{31}\text{P-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 1.16$ ppm (dd, $^1\text{J}(\text{PH}) = 588$ Hz, $^3\text{J}(\text{PH}) = 8.6$ Hz). $\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{BrN}_5\text{O}_8\text{P}$ (900.8)

Beispiel 10:

4-Benzoylamino-7-[(2-desoxy- β -D-erythropentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-5-methyl-7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin 3'-(Triethylammonium Phosphonat) (13)

Unter Argonatmosphäre werden zu einer Lösung von 25 ml absolutem Dichlormethan, 290 μl (3.4 mmol) Phosphortrichlorid und 3.44 g (34.0 mmol) N-Methylmorpholin bei Raumtemperatur 0.78 g (11.3 mmol) 1,2,4-H-Triazol gegeben. Nach 30-minütigem Rühren wird die Reaktionslösung auf 0°C abgekühlt und innerhalb von 10 min mit einer Lösung von 500 mg (0.75 mmol) des vollgeschützten Nucleosids (10) in 15 ml Dichlormethan versetzt. Man läßt weitere 20 min bei Raumtemperatur rühren und hydrolysiert anschließend mit 1 M Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TBK, pH = 7.5). Nach Phasentrennung, dreimaliger Extraktion der wäßrigen Phase mit je 20 ml Dichlormethan, Trocknen und Eindampfen der organischen Phase wird an Kieselgel chromatographiert (Säule 20 · 5 cm, 0.5 l Dichlormethan/ Et_3N 98:2, danach Dichlormethan/ Methanol/ Et_3N 88:10:2). Die Hauptzone wird eingedampft, in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und mehrmals mit 0.1 M TBK-Puffer extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 und Abdampfen des Lösungsmittels erhält man 440 mg (0.53 mmol, 70%) der Verbindung (13) als farblosen Schaum.

DC (Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol 9:1): $R_f = 0.65$.

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 1.16$ (t, 9H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$), 2.09 (s, 5- CH_3), 2.24 (m, 2' α -H), 2.67 (m, 2' β -H), 3.00 (q, 6H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$), 3.20 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, 2 OCH_3), 4.13 (m, 4'-H), 4.83 (m, 3'-H), 6.65 (pt, J = 6.5 Hz, 1'-H), 6.68 (d, J = 588.5 Hz, P-H), 6.85 (m, 4H, DMT), 7.2-7.6 (m, 12H, aromatische Protonen), 7.58 (s, 6-H), 8.05 (d, 2H, ortho- H_{Bz}), 8.60 (s, 2-H), 10.98 (br, 4-NH). $^{31}\text{P-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 1.08$ ppm (dd, $^1\text{J}(\text{PH}) = 577$ Hz, $^3\text{J}(\text{PH}) = 8.9$ Hz). $\text{C}_{46}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$ (835.8)

Beispiel 11:

4-Amino-5-brom-7-(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin 5'-O-Triphosphat, Triethylammoniumsalz

Verbindung (2) (33 mg, 0.1 mmol) wird zusammen mit 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin (33 mg, 0.15 mmol) in Trimethylphosphat (0.25 ml) unter leichtem Erwärmen in Lösung gebracht. Nach Abkühlen auf 0°C erfolgt eine Zugabe von frisch destilliertem POCl_3 (12 μl , 0.13 mmol). Das Reaktionsgemisch wird für 4 h bei 4°C gehalten und anschließend eine Lösung aus Tri-n-butylammoniumdiphosphat (0.5 M in DMF, 1 ml) und Tri-n-butylamin (100 μl , 0.42 mmol) zugegeben. Nach 3 min Rühren bei 0°C wird die Mischung mit 1 M TBK-Puffer (10 ml) versetzt und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird an DEAD Sephadex (Säule 1.5 \times 20 cm, HCO_3^- -Form) chromatographiert. Nach Waschen mit ca. 500 ml H_2O wurde mit einem linearen Gradienten von H_2O /0.9 M TBK-Puffer (je 1 l) chromatographiert. Dabei erhält man das Triphosphat (0.019 mM, 20%) bei ca. 0.5 M TBK-Puffer.

DC (Kieselgel, i-Propanol/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$, 3:1:1): $R_f = 0.2$.

UV (H_2O): $\lambda_{\text{max}} = 269 \text{ nm}$.

^{31}P -NMR (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA/ D_2O): -11.87 (d, J = 20.2, P_γ); -10.98 (td, J = 20.0 und 6.0, P_α); -23.06 (t, J = 20.2, P_β).

Beispiel 12:

4-Amino-7-(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-jod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (14) (5-Jod-2'-desoxytubercidin).

Zu 1.0 g (2.5 mmol) 4-Chlor-7-[2-desoxy-3,5-di-O-(4-toluoyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-5-jod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin, gelöst in 80 ml Dioxan, wird 25%iges wäßriges Ammoniak hinzugegeben. Der Ansatz wird 48 h bei 110°C in einer Stahlbombe gerührt. Nach Abdampfen wird der eingeeengte Rest auf Kieselgel chromatographiert (Säule 20x5 cm, Lösungsmittel B). Farblose Kristalle von MeOH (0.75 g, 2.0 mmol, 45%). M.p. 194°C. TLC: R_f 0.4 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). UV (MeOH) 283 nm (5 800).

^1H -NMR (D_6 -DMSO): 2.16 (m, H-2' α), 2.46 (m, H-2' β , überlagert von DMSO), 3.54 (m, 2-H, H-5'), 3.81 (m, H-4'), 4.33 (m, H-3'), 5.00 (t, J = 5.1 Hz, 5'-OH), 5.23 (d, J = 5.1 Hz, 3'-OH), 6.49 (pt, J = 6.7 Hz, H-1'), 6.65 (br, NH_2), 7.65 (s, H-6), 8.10 (s, H-2).

^{13}C -NMR (D_6 -DMSO) 157.3 (C-4), 152.0 (C-2), 149.8 (C-7a), 126.9 (C-6), 103.2 (C-4a), 87.5 (C-4'), 83.0 (C-1'), 71.0 (C-3'), 62.0 (C-5'), 51.9 (C-5), 39.8 (C-2').

Anal. berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{IN}_4\text{O}_3$:	C 35.13,	H 3.48,	N 14.90;	gefunden:
	C 35.33,	H 3.69,	N 15.01.	

Beispiel 13:

Kreuzkupplungsreaktion von 5-Jod-2'-Desoxytubercidin (14)

5-Jod-2'-desoxytubercidin (14) (200 mg, 0.532 mmol) und Kupfer(I)Jodid (10 mg, 10 mol%) werden in 3 ml trockenem, mit Argon vorgespülten DMF suspendiert und mit Alkin (6-15 eq.), trockenem Triethylamin (108 mg, 1.06 mmol, 2 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (0) (30.75 mg, 0.027 mmol, 5 mol%) versetzt.

Innerhalb einiger Stunden entsteht aus der Mischung eine klare gelbe Lösung. Die Reaktion wird solange fortgeführt, bis die Ausgangsprodukte verbraucht sind (Überprüfung mittels Dünnschichtchromatographie). Das Reaktionsgemisch wird dann mit 5 ml Methanol-Dichlormethan (1:1) verdünnt und mit Dowex 1x8 (100-200 mesh; 500 mg, Bicarbonatform) versetzt. Nachdem nach 15 Minuten Rühren die Gasbildung zum Stillstand kommt wird noch für weitere 30 Minuten gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch filtriert und die Matrix mit Methanol-Dichlormethan (1:1) gewaschen. Die Filtrate werden vereinigt und getrocknet. Der getrocknete Rückstand wird sofort über eine Kieselgelsäule (25 g) unter Verwendung von Dichlormethan mit zunehmenden Gehalt von Methanol (10, 15, 20%) chromatographiert. Nach Eindampfen der Hauptfraktion erhält man das substituierte 2'-Desoxytubercidinderivat.

Beispiel 14:

4-Benzoylamino-5-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin 3'-(Triethylammonium Phosphonat) (15)

a) 7-Desaza-2'-desoxy-7-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-adenosin

5-Jod-2'-desoxytubercidin (14) aus Beispiel 12 wird unter den in Beispiel 13 beschriebenen Bedingungen über 9 h an N-Propargyltrifluoracetamid gekoppelt. Folgende Mengen werden eingesetzt: 5-Jod-2'-desoxytubercidin (14) (200 mg, 0.532 mmol), Kupfer(I)jodid (5.0 mg, 0.0236 mmol, 5 mol%), DMF (3 ml), N-Propargyltrifluoracetamid (482 mg, 3.2 mmol, 6 eq.), Triethylamin (108 mg, 1.06 mmol, 2 eq.), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (0) (61.5 mg, 0.0532 mmol, 10 mol%).

Nach Chromatographie wird der Feststoff aus Ethylacetat umkristallisiert:

Blaßgelbe Kristalle (70 mg, 0.176 mmol, 33%). M.p. 187-188°C. TLC: R_f 0.30 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). UV (MeOH) 237 (14 400), 279 (14 200).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$) 10.07 (s, 1H, NHTFA), 8.12 (s, 1H, H-2), 7.76 (s, 1H, H-6), 6.79 (broad s, 2H, NH_2), 6.49 (pt, 1H, H-1', J = 6.6 Hz), 5.25 (d, 1H, 3'-OH, J = 3.0 Hz), 5.05 (t, 1H, 5'-OH, J = 4.5 Hz), 4.35 (m, 1H, H-3'), 4.32 (d, 2H, CH_2 , J = 4.2 Hz), 3.84 (m, 1H, H-4'), 3.56 (m, 2H, H-5') 2.47 (m, 1H, H-2'B), 2.19 (m, 1H, H-2'A).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): 157.4 (C-4), 156.4 und 156.1 (C=O), 152.7 (C-2), 149.2 (C-7a), 126.5 (C-6), 116.8 und 114.6 (CF_3), 102.2 (C-4a), 94.0 (C-5), 87.5 (C-4'), 86.7 and 76.2 (C=C), 83.2 (C-1') 70.9 (C-3'), 61.8 (C-5'), 39.6 (C-2', überlagert von DMSO), 29.9 (CH_2).

Anal. berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_4$: C 48.13, H 4.04, N 17.54; gefunden: C 48.26, H 4.13, N 17.58.

b) 4-Benzoylamino-5-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin

Die Einführung der Benzoylamino Schutzgruppe in 7-Desaza-2'-desoxy-7-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-adenosin erfolgt analog zu Beispiel 1.

c) 4-Benzoylamino-5-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin

Die Einführung der Dmt-Hydroxylschutzgruppe in 4-Benzoylamino-5-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin erfolgt analog zu Beispiel 5.

d) Die Titelverbindung (15) wird analog zu Beispiel 8 aus 4-Benzoylamino-5-(1-propinyl-3-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin hergestellt.

Beispiel 15:

4-Benzoylamino-5-(1-pentynyl-trifluoracetamid)-7-[(2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin 3'-(Triethylammonium Phosphonat) (16)

a) 7-Desaza-2'-desoxy-7-(1-pentynyl-trifluoracetamid)-adenosin

5-Jod-2'-desoxytubercidin (14) aus Beispiel 12 wird unter den in Beispiel 13 beschriebenen Bedingungen über 48 h an 5-Trifluoracetamid-1-pentin gekoppelt. Folgende Mengen werden eingesetzt: 5-Jod-2'-Desoxytubercidin (200 mg, 0.532 mmol), Kupfer(I)jodid (5 mg, 0.0236 mmol, 5 mol%), DMF (3 ml), 5-Trifluoracetamid-1-pentin (953 mg, 5.32 mmol, 10 eq.), Triethylamin (108 mg, 1.06 mmol, 2 eq.), Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (0) (61.5 mg, 0.0532 mmol, 10 mol%). Nach Chromatographie wird durch Kristallisation aus der Flüssigkeit ein schwach gelblicher ölig Rückstand (84.1 mg, 0.197 mmol, 37%) erhalten. M.p. 51-52°C. TLC: R_f 0.35 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). UV (MeOH) max = 239 (14 300), 280 (10 900). $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): 8.08 (s, 1H, H-2), 7.64 (s, 1H, H-6), 6.46 (pt, 1H, H-1', J = 6.9 Hz), 4.32 (m, 1H, H-3'), 3.80 (m, 1H, H-4'), 3.59-3.28 (mehrere m, 5H, H-5', $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 2.47 (m, 1H, H-2'B), 2.17 (m, 1H, H-2'A), 1.76 (Quintett, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$): 157.6 (C-4), 156.5 and 156.2 (C=O), 152.7 (C-2), 149.2 (C-7a), 125.7 (C-6), 118.5 and 114.0 (CF_3), 102.3 (C-4a), 95.5 (C-5), 91.6 (C=C, 1"), 87.6 (C-4'), 83.2 (C-1'), 74.0 (C=C, 2") 71.0 (C-3'), 62.0 (C-5'), 39.6 und 38.6 (C-2' und CH_2 , überlagert durch DMSO), 27.7 (CH_2), 16.6 (CH_2).

Anal. berechnet für $C_{18}H_{20}N_5O_4F_3$:	C 50.59,	H 4.72,	N 16.39;	gefunden:
	C 50.65,	H 4.82,	N 16.32.	

Die Titelverbindung (16) wird aus 7-Desaza-2'-desoxy-7-(1-pentynyltrifluoracetamid)-adenosin analog zu Beispiel 14b), 14c) und 14d) erhalten.

Beispiel 16:

2'-Desoxy-7-desaza-7-(2-carboxyethenyl)-adenosin (17).

5-Jod-2'-desoxytubercidin (14) aus Beispiel 12 wird unter den in Beispiel 13 beschriebenen Bedingungen über 65 h an Methylacrylat gekoppelt. Folgende Mengen werden eingesetzt: 5-Jod-2'-Desoxytubercidin (200 mg, 0.532 mmol), Kupfer(I)jodid (5 mg, 0.0236 mmol, 5 mol%), DMF (3 ml), Triethylamin (108 mg, 1.06 mmol, 2 eq.), Methylacrylat (686 mg, 8.0 mmol, 15 eq.), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (0) (61.5 mg, 0.0532 mmol, 10 mol%). Nach chromatographischer Aufreinigung wird ein blaßgelber Schaum erhalten und nach Waschen mit Dichlormethan werden 71.1 mg Festsubstanz erhalten (40%). M.p. 101-102°C. TLC: R_f 0.40 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1). UV (MeOH) Max = 268.0 (13 500), 324.8 (11 900).

1H -NMR (D_6 -DMSO): 8.11 (2s, 2H, H-2 and H-6), 7.94 (d, 1H, H-1", J= 15.6 Hz), 6.86 (s, 2H, NH_2), 6.51 (pt, 1H, H-1', J= 6.6 Hz), 6.4 (d, 1H, H-2", J= 15.6 Hz), 5.26 (d, 1H, 3'-OH, J= 3.6 Hz), 5.04 (t, 1H, 5'-OH, J= 5.1 Hz), 4.36 (m, 1H, H-3'), 3.83 (m, 1H, H-4'), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.55 (m, 1H, H-5'), 2.45 (m, 1H, H-2'B), 2.22 (m, 1H, H-2'a).

^{13}C -NMR (D_6 -DMSO): 166.9 (C=O), 158.0 (C-4), 152.1 (C-2), 151.2 (C-7a), 137.4 ($\underline{CH-C=O}$), 123.7 (C-6), 115.5 ($\underline{CH=CH-C=O}$), 111.5 (C-5), 101.0 (C-4a), 87.6 (C-4'), 83.2 (C-1'), 70.9 (C-3'), 62.0 (C-5'), 51.2 (OCH_3), 39.6 (C-2', überlagert durch DMSO).

Anal. berechnet für $C_{15}H_{18}N_4O_5$: C 53.89, H 5.43, N 16.76; gefunden: C 53.79, H 5.56, N 16.74.

Beispiel 17:

7-[2-Desoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-4-methoxy-2-[(formyl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (18).

7-(2-Desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-4-methoxy-2-[(formyl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (1.0 g, 3.3 mmol) [F. Seela, H. Driller, Nucleosides, Nucleotides 1989, 8, 1-21] in Acetonitril (20 ml) wurde bei Raumtemperatur mit Isobuttersäureanhydrid (33 mmol) in Gegenwart von Triethylamin (23 mmol) 15 Stunden lang gerührt. Das Lösungsmittel wird abgedampft und mit Methanol nachgedampft. Der Rückstand wird im Laufmittel Methylenchlorid/Aceton (95:5) chromatographiert, die Hauptzone isoliert und der Inhaltsstoff aus Cyclohexan umkristallisiert. 1.26 g (89 %) farbloser Feststoff.

1H NMR ($[D_6]DMSO$), δ : 1.05 - 1.14 (m, 4 CH_3), 2.60, 2.90 (m, CH und 2'-Ha,b), 4.02 (s, OCH_3), 4.16 (m, 5'-H), 4.26 (m, 4'-H), 5.35 (m, 3'-H), 6.47 (m, 1'-H), 6.52 (d, 5-H), 7.39 (d, 6-H), 9.44 (d, NH), 10.71 (d, HCO).

Beispiel 18:

5-Brom-7-[2-desoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-4-methoxy-2-[(formyl)-amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (19).

Eine Lösung von Verbindung 18 (10.1 mmol) in Dimethylformamid wurde mit H-Bromsuccinimid (10.1 mmol) bei Raumtemperatur 1 Stunde gerührt. Zum Abpuffern wird die Lösung mit einigen Tropfen 5 %igem wässrigem $NaHCO_3$ versetzt und dann Methylenchlorid hinzugefügt. Die organische Phase wird mit Wasser gegengeschüttelt, separiert, über Natriumsulphat getrocknet und abgedampft. Die Chromatographie des Rückstandes an einer Kieselgelsäule im Laufmittel Dichlormethan/Aceton (95:5) führt zu zwei Zonen. Der Abdampfückstand der langsam wandernden Hauptzone liefert farbloses (19) (75 %) als Feststoff.

1H NMR ($[D_6]DMSO$), δ : 1.05 - 1.14 (m, 4 CH_3), 2.60, 2.88 (m, CH und 2'-Ha,b), 4.04 (s, OCH_3), 4.16 (m, 5'-H), 4.22 (m, 4'-H), 5.34 (m, 3'-H), 6.46 (m, 1'-H), 7.60 (s, 6-H), 9.43 (s, NH), 10.86 (s, HCO).

Aus der schnell wandernden Nebenzone der oben genannten Reaktion wird ein farbloser Feststoff erhalten der als 5,6-Dibrom-7-[2-desoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-4-methoxy-2-[(formyl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin charakterisiert wurde.

¹H NMR ([D₆]DMSO), δ: 0.99 - 1.13 (m, 4CH₃), 2.59, 3.58 (m, CH und 2'-Ha,b), 4.03 (s, OCH₃), 4.16 (m, 5'-H), 4.30 (m, 4'-H), 5.56 (m, 3'-H), 6.39 (m, 1'-H), 9.42 (s, NH), 10.91 (s, HCO).

Beispiel 19:

5-Chlor-7-[2-desoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-methoxy-2-amino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (20).

Die Substanz wurde unter Verwendung von N-Chlorsuccinimid analog der Verbindung (19) dargestellt und aufgearbeitet. Die Reaktionszeit der Halogenierung betrug 8 Stunden. Als Lösungsmittel wurde Acetonitril/DMF (4:1) verwendet. Farbloser Feststoff (70 %).

¹H NMR ([D₆]DMSO), δ: 1.07 - 1.13 (m, 4CH₃), 2.59, 2.74 (m, CH und 2'-Ha,b), 3.93 (s, OCH₃), 4.15 (m, 5'-H), 4.21 (m, 4'-H), 5.25 (m, 3'-H), 6.39 (m, 1'-H), 6.47 (s, NH₂), 7.20 (s, 6-H).

Als Nebenprodukt entstand als farbloser Feststoff die Verbindung 5,6-Dichlor-7-[2-desoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-methoxy-2-amino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin.

¹H NMR ([D₆]DMSO), δ: 1.03 - 1.13 (m, 4CH₃), 2.58, 3.40 (m, CH und 2'-Ha,b), 3.93 (s, OCH₃), 4.16 (m, 5'-H), 4.37 (m, 4'-H), 5.44 (m, 3'-H), 6.37 (m, 1'-H), 6.58 (s, NH₂).

Beispiel 20:

2-Amino-7-(2'-desoxy-β-erythro-pentofuranosyl)-3,7-dihydro-5-brom-4-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (21)

Die Verbindung (19) wird nach einem bekannten Verfahren umgesetzt [F.Seela, B. Westermann, U. Bindig, J. Chem. Soc. Perkin Trans I 1988, 699]. 500 mg der Verbindung (19) wird in 200 ml 2N NaOH 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die abgekühlte Lösung wird mit Eisessig neutralisiert, der anorganische Rückstand wird abfiltriert und die wässrige Phase abgedampft. Umkristallisation aus Wasser liefert farblose Kristalle von (21).

Beispiel 21:

2-Amino-7-(2'-desoxy-β-erythro-pentofuranosyl)-3,7-dihydro-5-chlor-4-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (22)

Die Verbindung (22) wird ausgehend von der Verbindung (20) analog zu dem im Beispiel 20 beschriebenen Verfahren hergestellt. Umkristallisation aus Wasser liefert farblose Kristalle von (22).

Beispiel 22:

4-Amino-7-[2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl]-5-trimethylsilylethynyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (23)

Verbindung (23) wird nach der allgemeinen Vorschrift der Kreuzkupplungsreaktion in Beispiel 13 aus Trimethylsilylacetylen dargestellt. Farbloser Feststoff. Ausbeute 54%

Ber. C 55.47, H 6.40, N 16.17. Gef. C 55.57, H 6.53, N 16.20.

¹H NMR (DMSO): 8.12 (s, 1H, H-2), 7.80 (s, 1H, H-6), 6.76 (breit, 2H, NH₂), 6.47 (t, 1H, H-1', J = 6.7 Hz), 5.23 (d, 1H, 3'-OH, J = 3.3 Hz), 5.07 (t, 1H, 5'-OH), 4.33 (m, 1H, H-3'), 3.87 (m, 1H, H-4'), 3.54 (m, 2H, H-5'), 2.46 (m, 1H, H-2'), 2.17 (m, 1H, H-2'), 0.73 (s, 9H, Me).

Beispiel 23:

4-Amino-7-[2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl]-5-ethynyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (24)

200 mg der Verbindung (23) werden in 20 ml MeOH gelöst. Zugabe von 8mg K₂CO₃ führt nach 1h Rühren zur Hydrolyse. Nach Einrotieren der Lösung wird der Rückstand an Kieselgel im Laufmittel Methylenchlorid/MeOH (8:1) chromatographiert. Umkristallisation aus MeOH führt zu farblosen Kristallen (73%).

Ber. C 56.93, H 5.15, N 20.43. Gef. C 56.77, H 5.71, N 20.42.

¹H NMR (DMSO): 8.13 (s, 1H, H-2), 7.81 (s, 1H, H-6), 6.65 (breit, 2H, NH₂), 6.49 (t, 1H, H-1'), 5.25 (m, 1H, 3'-OH), 5.05 (m, 1H, 5'-OH), 4.36 (m, 1H, H-3'), 4.26 (s, 1H, Ethin), 3.84 (s, 1H, H-4'), 3.56 (m, 2H, H-5'), 2.47 (m, 1H, H-2'), 2.21 (m, 1H, H-2').

Beispiel 24

4-Amino-7-[2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl]-5-hexinyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (25)

Verbindung (25) wird nach der allgemeinen Vorschrift der Kreuzkupplungsreaktion (Bsp. 13) unter Verwendung von 1-Hexin hergestellt. Umkristallisation aus MeOH führt zu farblosen Kristallen (Ausbeute: 48%).

Ber. C 61.80, H 6.71, N 19.96; Gef. C 61.68, H 6.60, N 16.90

¹H-NMR (DMSO) 8.31 (s, 1H, H-2), 7.65 (s, 1H, H-6), 6.65 (breit, 2H, NH₂), 6.49 (t, 1H, H-1'), 5.24 (m, 1H, 3'-OH) 5.05 (m, 1H, 5'-OH), 4.50 (m, 1H, 3'-H), 3.84 (m, 1H, H-4'), 3.56 (m, 2H, H-5'), 2.48 (m, 2H, CH₂C=), 2.46 (m, 1H, H-2'), 2.18 (m, 1H, H-2') 1.54 (m, 2H, CH₂), 1.43 (m, 2H, CH₂), = 0.93 (m, 2H, CH₃).

Beispiel 25:

2-Amino-6-chlor-7[2-desoxy-3,5-di-O-acetyl-β-D-erythropentofuranosyl]-4-methoxy-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin.

Eine Lösung von 50 mg (0.14 mmol) 2-Amino-7(2-desoxy-3,5-di-O-acetyl-β-D-erythro-pentofuranosyl)-4-methoxy-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin in 3 ml Dichlormethan werden mit 36.6 mg (0.27 mmol) N-Chlorsuccinimid versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der Rückstand an Kieselgel in CH₂Cl₂/Aceton (9:1) chromatographiert.

Aus der langsam wandernden Hauptzone erhält man 30 mg (54 %) farblosen Schaum.

¹H-NMR D₆ (DMSO): 1.99 (s, 3H, CH₃), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.37 (m, 1H, H-2'b), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 4.18 (m, 2H, H-5'), 4.43 (m, 1H, H-4), 5.44 (m, 1H, H-3'), 6.38 (m, 1H, H-1'), 6.42 (s, 1H, H-5).

¹³C-NMR (DMSO): 20.48 (CH₃), 20.76 (CH₃), 33.78 (C-2'), 52.99 (OCH₃), 63.47 (C-5'), 74.31 (C-3'), 80.91 (C-4'), 82.95 (C-1'), 96.45 (C-4a), 98.65 (C-5), 118.12 (C-6), 153.69 (C-7a), 159.25 (C-2), 162.16 (C-4), 169.98 (C=O), 170.09 (C=O).

Beispiel 26:

2-Amino-5,6-dichlor-7[2-desoxy-3,5-di-O-acetyl-β-D-erythropentofuranosyl]-4-methoxy-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin.

Die schneller wandernde Zone liefert einen farblosen Schaum. 6 mg (9.9 %).

¹H-NMR (DMSO): 1.98 (s, 3H, CH₃), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.24 (m, 1H, H-2'b), 2.73 (m, 1H, H-2'a), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 4.14 (m, 2H, H-5'), 4.39 (m, 1H, H-4), 5.40 (m, 1H, H-3'), 6.39 (m, 1H, H-1'), 6.59 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (DMSO): 20.47 (CH₃), 20.75 (CH₃), 34.06 (C-2'), 53.34 (OCH₃), 63.41 (C-5'), 74.09 (C-3'), 81.01 (C-4'), 83.26 (C-1'), 94.59 (C-4a), 102.08 (C-5), 115.16 (C-6), 151.94 (C-7a), 159.59 (C-2), 162.08 (C-4), 169.97 (C=O), 170.07 (C=O).

UV (MeOH): λ_{max} (ε): 290 nm (8500), 264 nm (13100), 226 nm (22700).

Beispiel 27:

7-(2-Desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-4-[(dimethylamino)methyliden]amino-5-iod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (26)

Eine Lösung von 5-Iod-2'-Desoxytubercidin (14) (400 mg, 1.06 mmol) in Methanol (20 ml) wird mit N,N-Dimethylformamid Dimethylacetal (2.0 g, 16.8 mmol) für 2h bei 40°C gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird der Rest über Flashchromatographie (FC) (Säule: 20 x 5 cm, CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1) aufgereinigt. Die Hauptzone liefert einen farblosen Schaum (389 mg, 85 %). TLC (Dünnschichtchromatographie, Silicagel, CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1): R_f 0.46. UV (MeOH): max = 229 nm (17400), 277 nm (10400), 323 nm (19000). ¹H-NMR (D₆)DMSO: 2.18 (m, 1H, H_α-2'); 2.47 (m, 1H, H_β-2', überlagert von DMSO); 3.18, 3.22 (2s, 6H, N(CH₃)₂); 3.54 (m, 2H, H-5'); 3.81 (m, 1H, H-4'); 4.32 (m, 1H, H-3'); 5.00 (t, J = 5.4 Hz, 1H, 5'-OH); 5.23 (d, J = 3.9 Hz, 1H, 3'-OH); 6.52 (t, J = 7.0 Hz, 1H, H-1'); 7.70 (s, 1H, H-6); 8.30 (s, 1H, H-2); 8.82 (s, 1H, N=CH). Anal. berechnet für C₁₄H₁₈N₅O₃I: C 38.99, H 4.21, N 16.24; gefunden: C 39.09, H 4.27, N 16.10.

Beispiel 28:

7-(2-Desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-4-[(dimethylamino)methyliden]amino-5-hexinyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (27)

Eine Lösung von 5-Hexinyl-2'-desoxytubercidin (25) (400 mg, 1.21 mmol) in Methanol (20 ml) wird mit N,N-Dimethylformamid Dimethylacetal (2.0 g, 16.8 mmol) für 2h bei 40°C gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird der Rest über Flash-Chromatographie (FC) (Säule: 20 x 5 cm, CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1) aufgereinigt. Die Hauptzone liefert einen farblosen Schaum (373 mg, 80 %). TLC (Dünnschichtchromatographie, Silicagel, CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1): R_f 0.51. UV

(MeOH): max = 278 (12100), 321 (14300). ¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃); 1.45 (Sextett, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-CH₃); 1.53 (Quintett, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂CH₂-CH₃); 2.18 (m, 1H, H_α-2'); 2.47 (m, 3H, H_β-2', C=C-CH₂, überlagert von DMSO); 3.16, 3.18 (2s, 6H, N(CH₃)₂); 3.56 (m, 2H, H-5'); 3.83 (m, 1H, H-4'); 4.35 (m, 1H, H-3'); 5.02 (t, J = 5.5 Hz, 1H, 5'-OH); 5.26 (d, J = 3.9 Hz, 1H, 3'-OH); 6.50 ("t", J = 7.0 Hz, 1H, H-1'); 7.64 (s, 1H, H-6); 8.32 (s, 1H, H-2); 8.76 (s, 1H, N=CH).

Beispiel 29:

7-[2-Desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-[(dimethylamino)methyliden]amino-5-iod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (28)

Zu einer Lösung von Verbindung (26) (300 mg, 0.70 mmol) in getrockneten Pyridin (3 ml) wird 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (256 mg, 0.76 mmol) unter Argon-Atmosphäre hinzugegeben. Nach Rühren bei 50°C für 2 h wird eine 5% wässrige NaHCO₃-Lösung (15 ml) hinzugegeben. Die wässrige Phase wird mit CH₂Cl₂ extrahiert (3 mal, jeweils 50 ml). Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend eingedampft. Nach Flash-Chromatographie (FC) (Säule: 20 x 5 cm, B) des Restes wird ein farbloser Schaum erhalten (360 mg, 70 %). TLC (Silicagel, B): R_f 0.60. UV (MeOH) max = 236 (38400), 275 (14200), 322 (18900). ¹H-NMR (D₆DMSO): 2.24 (m, 1H, H_α-2'); 2.47 (m, 1H, H_β-2', überlagert durch DMSO); 3.18 (m, 2H, H-5'), überlagert durch NaCH₃; 3.18, 3.22 (2s, 6H, N(CH₃)₂); 3.72 (s, 6H, 2 OCH₃); 3.92 (m, 1H, H-4'); 4.37 (m, 1H, H-3'); 5.30 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 3'-OH); 6.54 ("t", J = 6.6 Hz, 1H, H-1'); 6.84 (m, 4H, arom. H); 7.22 - 7.38 (m, 9H, arom. H); 7.56 (s, 1H, H-6); 8.31 (s, 1H, H-2); 8.82 (s, 1H, N=CH). Anal. berechnet für C₃₅H₃₆N₅O₅I: C 57.30, H 4.95, N 9.55; gefunden: C 57.48, H 5.12, N 9.44.

Beispiel 30:

7-[2-Desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-[(dimethylamino)methyliden]amino-5-hexinyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (29)

Zu einer Lösung von Verbindung (27) (300 mg, 0.78 mmol) in getrockneten Pyridin (3 ml) wird 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (290 mg, 0.86 mmol) unter Argon-Atmosphäre hinzugegeben. Nach Rühren bei 50°C für 2 h wird eine 5% wässrige NaHCO₃-Lösung (15 ml) hinzugegeben. Die wässrige Phase wird mit CH₂Cl₂ extrahiert (3 mal, jeweils 50 ml). Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend eingedampft. Nach Flash-Chromatographie (FC) (Säule: 20 x 5 cm, B) wird ein farbloser Schaum erhalten (360 mg, 62 %). TLC (Silicagel, B): R_f 0.60. UV (MeOH) max = 276 (17500), 320 (12900). ¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃); 1.45 (Sextett, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-CH₃); 1.53 (Quintett, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₃); 2.18 (m, 1H, H_α-2'); 2.47 (m, 3H, H_β-2' C=C-CH₂, überlagert durch DMSO); 3.16, 3.18 (2s, 6H, N(CH₃)₂); 3.18 (m, 2H, H-5'), überlagert durch N(CH₃)₂; 3.71 (s, 6H, 2 OCH₃); 3.91 (m, 1H, H-4'); 4.34 (m, 1H, H-3'); 5.28 (d, J = 3.9 Hz, 1H, 3'-OH); 6.53 ("t", J = 7.0 Hz, 1H, H-1'); 6.82 (m, 4H, arom. H); 7.20 - 7.36 (m, 9H, arom. H); 7.56 (s, 1H, H-6); 8.30 (s, 1H, H-2); 8.97 (s, 1H, N=CH).

Beispiel 31:

7-[2-Desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-[(dimethylamino)methyliden]amino-5-iod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin - 3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit (30)

Zu einer gerührten Lösung des getrockneten Nukleosids (28) (300 mg, 0.41 mmol) und wasserfreien N,N-Diisopropylethylamin (212 mg, 1.64 mmol) in getrockneten THF (2 ml) werden unter Argon-Atmosphäre Chlor-(2-cyano-ethoxy)-N,N-Diisopropylamino-phosphin (194 mg, 0.82 mmol) hinzugegeben. Der Ansatz wird 30 Minuten gerührt und anschließend filtriert. Das Filtrat wird mit Ethylacetat (30 ml) versetzt und zweimal mit eiskalter wässriger 10% Na₂CO₃-Lösung (2 x 10 ml) und 10 ml Wasser extrahiert. Die organischen Phasen werden über wasserfreien Na₂SO₄ getrocknet und anschließend eingedampft. Nach Flash-Chromatographie (FC) (Säule: 10 x 3 cm, Petrolether/Aceton) wird ein farbloser Schaum erhalten (222 mg, 60 %). TLC (Silica Gel, Petrolether/Aceton 1 : 1): R_f 0.38, 0.45. ³¹P-NMR CDCl₃: 149.0, 149.2.

Beispiel 32:

7-[2-Desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-4-[(dimethylamino)methyliden]amino-5-hexinyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit (31)

Zu einer gerührten Lösung des getrockneten Nukleosids 29 (300 mg, 0.44 mmol) und wasserfreien N,N-Diisopropylethylamin (212 mg, 1.64 mmol) in getrockneten THF (2 ml) werden unter Argon-Atmosphäre Chlor-(2-cyano-ethoxy)-N,N-diisopropylamino-phosphin (194 mg, 0.82 mmol) hinzugegeben. Der Ansatz wird 30 Minuten gerührt und anschlie-

ßend filtriert. Das Filtrat wird mit Ethylacetat (30 ml) versetzt und zweimal mit eiskalter wässriger 10% Na₂CO₃-Lösung (2 x 10 ml) und 10 ml Wasser extrahiert. Die organischen Phasen werden über wasserfreien Na₂SO₄ getrocknet und anschließend eingedampft. Nach Flash-Chromatographie (FC) (Säule: 10 x 3 cm, Petrolether/Aceton) wird ein gelber Schaum erhalten (229 mg, 60 %). R_f 0.45, 0.53. ³¹P-NMR CDCl₃ : 149.0, 149.3.

5

Beispiel 33:

4-Amino-7-(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-methylthio-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (32)

10 Ausgehend von 2',3',5'-tri-O-acetyl-7-desazaadenosin wird durch Umsetzung dieser Verbindung mit Thiocyanogenchlorid in Essigsäure das entsprechende 5-Thiocyanat-Derivat gebildet. Reduktion mit 2-Mercaptoethanol und anschließende Methylierung liefert das 5-Methylthio-Derivat mit einem ungeschützten Zuckerrest (Watanabe et al., Nucleosides & Nucleotides, 1 (2), 191-203, 1982). Die Methylthioverbindung (32) erhält man durch selektive Silylierung der 3',5'-OH-Gruppen und anschließender Barton-Desoxygenierung über den entsprechenden Thionoester.

15

Beispiel 34:

4-Amino-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-morpholinomethyl-7H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidine (33)

20 Die Herstellung von (33) ist möglich durch Anwendung der Mannich Reaktion. Durch Erhitzen von Tubercidin zusammen mit Paraformaldehyd und Morpholin in DMF erhält man das 5-Morpholinomethyl-Derivat (Watanabe et al., Nucleosides & Nucleotides, 1 (2), 191-203, 1982). Das 5-Morpholin Derivat (33) wird entsprechend der in Bsp. 33 beschriebenen Silylierung und Desoxigenierung erhalten.

25 Beispiel 35:

4-Amino-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-trifluoromethyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (34)

30 Verbindung 34 wird durch Reaktion von Verbindung (14) mit CF₃Cu entsprechend der Vorschrift von Nair et al. (J. Am. Chem. Soc., 111, 8502-8504, 1989) erhalten.

Beispiel 36:

35 4-Amino-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-nitro-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (35) und 4-Amino-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-6-nitro-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (36)

40 Durch Behandlung von 2',3',5'-tri-O-acetyl-7-desazaadenin mit HNO₃/H₂SO₄ in Methylenchlorid erhält man eine Mischung aus 5- bzw. 6-substituierten Nitroderivate. Als Hauptprodukt entstehen 5-Nitro Derivate (Watanabe et al., Nucleosides & Nucleotides, 1 (2), 191-203, 1982). Deacylierung, 3',5'-OH Silylierung und 2'-Deoxygenierung führt zu den Verbindungen (35) und (36).

Beispiel 37:

4-Amino-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-6-cyano-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (37)

45 Oxidation von Verbindung (32) führt zum 5-Methylsulfon-Derivat. Behandlung mit NaCN in DMF liefert das 6-Cyano Derivat (37), ein Regioisomer des Toyocamycins (Watanabe et al., Nucleosides & Nucleotides, 1 (2), 191-203, 1982). Silylierung und Deoxygenierung erfolgt gemäß Bsp. 33.

50 Beispiel 38:

4-Amino-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-carboxy-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (38)

Verbindung (38) wird durch Hydrolyse von Verbindung (37) erhalten.

55

Beispiel 39:

4-Amino-5,6-dibrom-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (66)

5 Methode A: Zu einer Lösung von 2'-Desoxytubercidin (1.0 g, 4.0 mmol) und NaOAc (0.78 g, 8.0 mmol) in getrocknetem DMF (10 ml) wird bei Raumtemperatur NBS (1.42 g, 8.0 mmol, gelöst in 4 ml in getrocknetem DMF) gegeben. Die rote Lösung wird 10 Minuten gerührt und anschließend eingedampft. Nach Flash-Chromatographie (Säule: 20 x 5 cm, CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1), Eindampfen der schneller wandernden Zone und anschließender Umkristallisation aus Iso-
 10 propanol erhält man Titelverbindung (38) als farblose Kristalle (400 mg, 25%). Isolierung der langsamer wandernden Zone liefert 5-Brom-2'-deoxytubercidin (130 mg, 10 %). Methode B: Zu einer Lösung von 5-Brom-2'-deoxytubercidin (1.3 g, 4.0 mmol) und NaOAc (0.785 g, 8.0 mmol) in getrocknetem DMF (10 ml) wird eine Lösung von NBS (1.42 g, 8.0 mmol, in 4 ml getrocknetem DMF gelöst) gegeben. Aufreinigung, siehe Methode A. Ausbeute: 490 mg, 30 % of 21. Schmelzpunkt: 181°C. TLC (Silicagel, CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1): R_f 0.40. ¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 2.12 (m, H_α-2'); 2.50 (m, H_β-2'); 3.51 (m, 2H, H-5'); 3.84 (m, 1H, H-4'); 4.44 (m, 1H, H-3'); 5.20, (br, 2H, 5'-OH, 3'-OH); 6.42 ("t", J = 6.2 Hz, 1H, H-1'); 6.93 (br, 2H, NH₂); 8.10 (s, 1H, H-2).

Beispiel 40:

4-Amino-5,6-dichlor-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (39)

20 Die Titelverbindung (39) erhält man aus dem 5-Chlornucleosid (1) durch Chlorierung mit N-Chlorsuccinimid.

Beispiel 41:

25 4-Amino-5-iod-6-chlor-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (40)

Die Titelverbindung (40) erhält man aus dem 5-Iodnucleosid (14) durch Chlorierung mit N-Chlorsuccinimid.

Beispiel 42:

30 4-Amino-5-iod-6-brom-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (41)

Die Titelverbindung (41) erhält man aus dem 5-Iodnucleosid (14) durch Bromierung mit N-Bromsuccinimid.

35 Beispiel 43:

4-Amino-5-brom-6-iod-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (42)

Die Titelverbindung (42) erhält man aus dem 5-Bromnucleosid (2) durch Iodierung mit N-Iodsuccinimid.

40 Beispiel 44:

4-Amino-5-chlor-6-brom-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (43)

45 Die Titelverbindung (43) erhält man aus dem 5-Chlornucleosid (1) durch Bromierung mit N-Bromsuccinimid.

Beispiel 45:

50 4-Amino-5-chlor-6-iod-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (44)

Die Titelverbindung (44) erhält man aus dem 5-Chlornucleosid (2) durch Iodierung mit N-Iodsuccinimid.

Beispiel 46:

55 5-Chlor-7-[2-deoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-2-[(formyl)amino]-4-methoxy-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (45)

Zu einer Lösung von Verbindung (18) (300 mg, 0.67 mmol in 5ml DMF) wird N-chlorsuccinimid (87 mg, 0.67 mmol) gegeben. Nach Rühren (20 h bei Raumtemperatur) wird die Lösung zu einer Mischung von CH₂Cl₂/5 % aq. NaHCO₃

(50 ml, 9 : 1) zugegeben. Die organische Schicht wird abgetrennt, mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Der eingedampfte Rest wird in CH_2Cl_2 gelöst und über Silikagel chromatographiert (Säule: 5 x 20 cm, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$ 95 : 5). Die Hauptzone wird eingeeengt und mit n-Hexan versetzt. Die präzipitierten farblosen Kristalle (230 mg, 71%) werden isoliert. Schmelzpunkt: 119-120°C. $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.09 (d, J = 7.0, CH_3), 1.15 (d, J = 6.9, CH_3), 2.45, 2.60, 2.63, 2.89 (4m, CH and $\text{H}_{\alpha,\beta}\text{-C}(2'')$), 4.06 (s, OCH_3), 4.18 (m, H-C(5')), 4.28 (m, H-C(4')), 5.35 (m, H-C(3')), 6.47 (m, H-C(1')), 7.58 (s, H-C(6)), 9.45 (d, J = 8.9, NH), 10.84 (d, J = 9.6, HCO). Anal. berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ClN}_4\text{O}_7$ (482.9): C 52.23, H 5.64, N 11.60; gefunden: C 52.51, H 5.69, N 11.65.

Beispiel 47:

7-[2-Deoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-2-[(formyl)amino]-5-iod-4-methoxy-7H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidine (46)

Verbindung (46) wird ausgehend von Verbindung (18) (500 mg, 1.11 mmol) und N-Iodsuccinimid (264 mg, 1.16 mmol) wie für Verbindung (45) beschrieben hergestellt. Die Reaktionsdauer beträgt 23 h. Farblose Kristalle (590 mg, 92%) werden aus Cyclohexan erhalten. $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.9 (d, J = 7.0, CH_3), 1.15 (d, J = 7.0, CH_3), 2.46, 2.60, 2.89 (3 m, CH and $\text{H}_{\alpha,\beta}\text{-C}(2'')$), 4.06 (s, OCH_3), 4.17 (m, H-C(5')), 4.27 (m, H-C(4')), 5.35 (m, H-C(3')), 6.46 (m, H-C(1')), 7.62 (s, H-C(6)), 9.55 (d, J = 9.7, NH), 10.81 (d, J = 9.9 HCO). Anal. berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{IN}_4\text{O}_7$ (574.4): C 43.91, H 4.74, N 9.75; gefunden: C 43.98, H 4.75, N 9.82.

Beispiel 48:

6-Chlor-7-[2-deoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-2-[(formyl)amino]-5-iod-4-methoxy-7H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin (47)

Die Titelverbindung (47) erhält man aus dem 5-Iodnucleosid (46) durch Chlorierung mit N-Chlorsuccinimid.

Beispiel 49:

5-Brom-6-chlor-7-[2-deoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)- β -D-erythropentofuranosyl]-2-[(formyl)amino]-4-methoxy-7H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin (48)

Die Titelverbindung (48) erhält man aus dem 5-Bromnucleosid (19) durch Chlorierung mit N-Chlorsuccinimid.

Beispiel 50:

7-[2-Deoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-5,6-dichlor-2-[(formyl)amino]-4-methoxy-7H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin (49)

Zu einer Lösung von Verbindung (45) (200 mg, 0.4 mmol in 5ml DMF) wird N-chlorsuccinimid (117 mg, 0.9 mmol) gegeben. Nach Rühren (16 h bei Raumtemperatur) wird die Lösung zu einer Mischung von CH_2Cl_2 /5 % aq. NaHCO_3 (50 ml, 9 : 1) zugegeben. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Der eingedampfte Rest wird in CH_2Cl_2 gelöst und über Silikagel chromatographiert (Säule: 5 x 20 cm, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$ 95 : 5) Die Hauptzone wird abgetrennt. Nach Abdampfen des Lösungsmittel und Auskristallisation aus Cyclohexan werden farblose Kristalle erhalten (149 mg, 72%). Schmelzpunkt: 127-128°C. $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.01 (dd, CH_3), 1.14 (d, J = 7.0, CH_3), 2.44, 2.47, 2.60, 3.53 (4 m, CH and $\text{H}_{\alpha,\beta}\text{-C}(2'')$), 4.05 (s, OCH_3), 4.17 (m, H-C(5')), 4.30 (m, H-C(4')), 5.56 (m, H-C(3')), 6.41 (m, H-C(1')), 9.44 (d, J = 9.1, NH), 10.94 (d, J = 9.8, HCO). Anal. berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7$ (517.4): C 48.75, H 5.07, N 10.83; gefunden: C 49.04, H 5.09, N 10.66.

Beispiel 51:

5-Chlor-6-iod-7-[2-deoxy-3,5-di-O-(2-methylpropionyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-2-[(formyl)amino]-4-methoxy-7H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin (50)

Die Titelverbindung (50) erhält man aus dem 5-Chlornucleosid (45) durch Iodierung mit N-Iodsuccinimid.

Beispiel 52:

2-Amino-5,6-dichlor-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3,7-dihydro-4H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin-4-on (51)

Eine Suspension von Verbindung (49) (200 mg, 0.4 mmol) in 2N aq. NaOH (8 ml) wird für 3 h unter Rückfluß gekocht. Nach Neutralisierung der Lösung mit konz. AcOH wird das Reaktionsprodukt filtriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Nach Auskristallisation aus CH₃CN erhält man farblose Kristalle (128 mg, 96 %). ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.22 (m, H _{α} -C(2')), 2.92 (m, H _{β} -C(2')), 3.52 (m, H-C(5')), 3.72 (m, H-C(4')), 4.33 (m, H-C(3')), 4.81 (t, 5'-OH), 5.22 (d, 3'-OH), 6.35 (dd, H-C(1')), 6.46 (br., NH₂), 10.75 (s, NH).

Beispiel 53:

2-Amino-5-iod-6-chlor-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (52)

Titelverbindung (52) wird ausgehend von Verbindung (47) wie unter Beispiel 52 beschrieben hergestellt.

Beispiel 54:

2-Amino-5-brom-6-chlor-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (53)

Titelverbindung (53) wird ausgehend von Verbindung (48) wie unter Beispiel 52 beschrieben hergestellt.

Beispiel 55:

2-Amino-5-chlor-6-iod-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (54)

Titelverbindung (54) wird ausgehend von Verbindung (50) wie unter Beispiel 52 beschrieben hergestellt.

Beispiel 56:

2-Amino-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-methyl-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-4-on (55)

Titelverbindung (55) wird nach der in Winkeler et al. (Liebigs Ann. Chem. 1984, 708) beschriebenen Methode hergestellt.

Beispiel 57:

2-Amino-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-6-methyl-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (56)

Titelverbindung (56) wird analog zu Beispiel 55 hergestellt.

Beispiel 58:

2-Amino-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5,6-dimethyl-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (57)

Titelverbindung (57) wird analog zu Beispiel 55 hergestellt.

Beispiel 59:

2-Amino-7-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-iod-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (58)

Titelverbindung (58) wird ausgehend von Verbindung (46) (200 mg, 0.35 mmol) analog zu Beispiel 51 hergestellt. Es werden farblose Kristalle (126 mg, 92%) aus MeCN erhalten. Schmelzpunkt: 218 - 220°C. UV (MeOH): λ_{\max} 266 (12.000), 285 (sh, 8.400). ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 2.08 (m, H _{α} -C(2')), 2.30 (m, H _{β} -C(2')), 3.48 (m, H-C(5')), 3.74 (m, H-C(4')), 4.26 (m, H-C(3')), 4.89 (t, 5'-OH), 5.18 (d, 3'-OH), 6.25 (dd, H-C(1')), 6.34 (br., NH₂), 7.09 (s, H-C(6)), 10.51 (br., NH). Anal. berechnet für C₁₁H₁₃IN₄O₄ (392.2): C 33.69, H 3.34, N 14.29; gefunden: C 33.78, H 3.42, N 14.29.

Beispiel 60:

7-(2-Deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-iod-2-isobutyrylamino-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (59)

- 5 Nach dreimaligem Trocknen unter Abdampfen von Pyridin wird Verbindung (58) (300 mg, 0.76 mmol; gelöst in 4 ml getrocknetem Pyridin) mit 0.48 ml (3.78 mmol) Trimethylchlorsilan versetzt. Die Lösung wird 15 min gerührt. Nach Zugabe von 0.62 ml (3.78 mmol) Isobutyrylanhydrid wird die Lösung 3 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches im Eisbad wird 1 ml Wasser hinzugegeben. Nach 5 min wird 1 ml einer 25%igen wässrigen Ammoniaklösung hinzugegeben und 15 min gerührt. Die Lösung wird dann fast bis zur Trockenheit eingedampft.
- 10 Nach Auskristallisation aus Wasser werden farblose Kristalle erhalten (312 mg, 89%). ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 1.10 (2 CH₃), 2.12 (m, H_β-C(2')), 2.37 (m, H_α-C(2')), 2.73 (m, CH), 3.50 (m, H-C(5')), 3.78 (m, H-C(4')), 4.30 (m, H-C(3')), 4.89 (t, 5'-OH), 5.20 (d, 3'-OH), 6.35 (dd, H-C(1')), 7.43 (s, H-C(6)), 11.49, 11.76 (2s, 2 NH). Anal. berechnet für C₁₅H₁₉N₄O₅ (462.2): C 38.98, H 4.14, N 12.12; gefunden: C 39.11, H 4.37, N 11.96.

15 Beispiel 61:

7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-methyl-2-isobutyryl-amino-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (60)

- 20 Nach dreimaligem Trocknen unter Abdampfen von Pyridin wird Verbindung (55) (500 mg, 1.78 mmol; gelöst in 9 ml getrocknetem Pyridin) mit 1.2 ml (9 mmol) Trimethylchlorsilan versetzt. Die Lösung wird 15 min gerührt. Nach Zugabe von 1.2 ml (9 mmol) Isobutyrylanhydrid wird die Lösung 3 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches im Eisbad werden 1.8 ml Wasser hinzugegeben. Nach 5 min werden 1.8 ml einer 25%igen wässrigen Ammoniaklösung hinzugegeben und die Reaktion wird für weitere 15 min fortgesetzt. Das Gemisch wird dann fast bis zur Trockenheit eingedampft und in 10 ml Wasser aufgenommen, worauf sehr schnell farblose Kristalle auskristallisieren (555 mg, 89%).
- 25 Dünnschichtchromatographie (Silicagel, CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1): R_f = 0.7. ¹H-NMR [D₆-DMSO] 1.10 (d, J = 6.5 Hz, 2CH₃-C), 2.11, 2.28 (2m, 2H-C(2')), 2.23 (s, CH₃), 2.73 (q, J = 6.6 Hz, CH), 3.48 (m, 2H-C(5')), 3.75 (m, H-C(4')), 4.29 (m, H-C(3')), 4.85 (m, OH-C(5')), 5.20 (m, OH-C(3')), 6.36 (t, J = 6.7 Hz, H-C(1')), 6.94 (s, H-C(6)), 11.42, 11.67 (2s, 2NH). Anal. berechnet für C₁₆H₂₂N₄O₅ (350.37): C 54.84, H 6.33, N 15.99; gefunden: C 54.76, H 6.46, N 16.01.

30 Beispiel 62:

7-[2-Deoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-5-iod-2-isobutyrylamino-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (61)

- 35 Verbindung (59) wird wiederholt durch Abdampfen von wasserfreiem Pyridin getrocknet. 400 mg (0.87 mmol) der so getrockneten Verbindung (59) werden in 5 ml wasserfreiem Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (328 mg, 0.95 mmol) bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch übernacht gerührt. Anschließend werden MeOH (3 ml) und 5% aq. NaHCO₃ (30 ml) hinzugegeben. Die wässrige Phase wird 3 mal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), eingedampft und einer Flashchromatographie unterworfen (Säule: 10 x 5 cm, Lösungsmittel CH₂Cl₂/Aceton, 9 : 1). Isolierung des Materials aus der Hauptzone liefert die farblose, amorphe Titelverbindung (61). (600 mg, 91 %).
- 40 ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 1.13 (m, 4 CH₃), 2.24 (m, H-C(2')), 2.77 (m, CH), 3.12 (m, H-C(5')), 3.75 (s, 2 CH₃O), 3.93 (m, H-C(4')), 4.35 (m, H-C(3')), 5.30 (d, 3'-OH), 6.39 (dd, H-C(1')), 6.86 - 7.39 (m, aromatic H + H-C(6)), 11.54, 11.82 (2s, 2 NH). Anal. berechnet für C₃₆H₃₇N₄O₇ (764.6): C 56.55, H 4.88, N 7.33; gefunden C 56.42, H 4.82, N 7.30.

45

Beispiel 63:

7-[2-deoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-5-methyl-2-isobutyryl-amino-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (62)

50

- Verbindung (60) (390 mg, 1.1 mmol; getrocknet durch Abdampfen aus trockenem Pyridine, suspendiert in 8 ml getrocknetem Pyridin) wird mit (MeO)₂TrCl (448 mg, 1.3 mmol) versetzt und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von MeOH (5 ml) wird das Reaktionsgemisch mit 5% aq. NaHCO₃ (80 ml) versetzt. Nach Extraktion mit CH₂Cl₂ (3 x 50 ml) werden die organischen Phasen kombiniert, getrocknet (wasserfreies Na₂SO₄) und eingedampft. Der verbleibende Rest wird in CH₂Cl₂ gelöst und einer Flashchromatographie unterworfen. (Silikagel-Säule: 4 x 8 cm, Lösungsmittel CH₂Cl₂/MeOH 95:5 enthaltend Spuren von Et₃N). Die Hauptzone wird isoliert und Titelverbindung (62) wird als farblores Pulver erhalten (654 mg, 90 %).
- 55 Dünnschichtchromatographie (Silikagel, CH₂Cl₂/MeOH 95 : 5): R_f = 0.3. ¹H-NMR (d₆-DMSO): 1.10 (d, J = 6.7 Hz, 2CH₃-C); 2.16 (s, CH₃); 2.20, 2.40 (2m, 2H-C(2')); 2.74 (q, J = 6.8 Hz, CH); 3.12 (m, H-C(5')); 3.72 (s, 2CH₃O); 3.89 (m, H-C(4')); 4.34 (m, H-C(3')); 5.30 (d, J = 3.7 Hz, OH-C(3')); 6.38 (t, J = 6.7 Hz,

H-C(1'')); 6.7 - 7.4 (m, aromatic H and H-C(6)); 11.46, 11.71 (2s, 2NH). Anal. berechnet für C₃₇H₄₀N₄O₅ (652.72): C 68.08, H 6.18, N 8.58; gefunden: C 68.25, H 6.29, 8.50.

Beispiel 64:

7-[2-Deoxy-5-O-(4,4-dimethoxytrityl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-5-iod-2-isobutyrylamino-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on 3'-triethylammonium-phosphonat (63)

Zu einer Lösung von PCl₃ (180 μl, 2 mmol) und N-Methylmorpholin (2.2 ml) in CH₂Cl₂ (12 ml) wird 1,2,4-Triazol (480 mg, 6.8 mmol) gegeben. Die Lösung wird 30 min gerührt und dann langsam auf 0°C abgekühlt. 306 mg (0.4 mmol) der Verbindung (61) (gelöst in 12 ml CH₂Cl₂) werden langsam hinzugegeben und 30 min bei 0°C gerührt. Danach wird die Mischung in 1M (Et₃NH)HCO₃ (TBK, pH 8.0, 25 ml) gegeben, geschüttelt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit CH₂Cl₂ (3 x 30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden getrocknet (Na₂SO₄) und eingedampft. Nach Chromatographie (Säulen: 10 x 5 cm, Lösungsmittel CH₂Cl₂/Et₃N, 98 : 2, dann CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (88 : 10 : 2) erhält man nach Extraktion mit 0.1 M TBK (8 x 20 ml), Trocknen mit NCl₂SO₄ und Abdampfen Titelverbindung (63) (320 mg, 86%) als farblosen Schaum. ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 1.15 (m, 5 CH₃), 2.36, - 2.37 (m, H-C(2')), 2.76 (m, CH), 2.98 (m, 3 CH₂), 3.20 (m, H-C(5')), 3.75 (s, 2 MeO), 4.11 (m, H-C(4')), 4.80 (m, H-C(3')), 6.44 (dd, H-C(1')), 6.09 (s, pH), 6.87 - 7.39 (m, aromatic H + H-C(6)), 11.79 (br., 2 NH). ³¹P-NMR ([D₆]DMSO): 1.05 (J(P,H) = 587, 3J(p,H-C(3')) = 8.3 Hz).

Beispiel 65:

7-[2-Deoxy-5-O-(4,4-dimethoxytrityl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-5-methyl-2-isobutyryl-amino-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on, 3'-triethylammonium phosphonat (64)

Zu einer Lösung von PCl₃ (200 μl, 2.26 mmol) und N-Methylmorpholin (2.5 ml) in CH₂Cl₂ (14 ml) wird 1,2,4-Triazol (523 mg, 7.3 mmol) gegeben. Die Lösung wird 30 min gerührt und dann langsam auf 0°C abgekühlt. 300 mg (0.46 mmol) der Verbindung (62) (gelöst in 14 ml CH₂Cl₂) werden langsam hinzugegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Mischung in 1M (Et₃NH)HCO₃ (30 ml) gegeben, geschüttelt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit CH₂Cl₂ (3 x 40 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Der eingeeengte Rest wird einer Flashchromatographie unterworfen (Silikagel, Säule 3 x 7 cm, CH₂Cl₂/MeOH/Et₃NH 88 : 10 : 2). Die Fraktionen der Hauptzone werden gesammelt, eingedampft, in CH₂Cl₂ gelöst und mit 0.1 M (Et₃N)HCO₃ (5 x 15 ml) gewaschen. Die organische Phase wird mit wasserfreien Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Man erhält die Titelverbindung (64) als farblosen Schaum (270 mg, 72 %). Dünnschichtchromatographie (Silicagel, CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N 88 : 10 : 2): R_f = 0.5. ¹H-NMR (D₆-DMSO): 1.16 (m, 5CH₃); 2.19 (s, CH₃); 2.30, (m, H-C(2')); 2.74 (q, J = 6.3 Hz, CH); 3.00 (q, J 6.4 Hz, 3CH₂); 3.13, 3.18 (2m, 2H-C(5')); 3.75 (s, CH₃O); 4.01 (m, H-C(4')); 4.77 (m, H-C(3')); 6.43 (d, J (P,H) = 346 Hz, PH); 6.45 (t, J = 6.7 Hz H-C(1')); 6.8 - 7.4 (m, aromatic H and H-C(6)); 11.67, 11.69 (2s, 2NH). ³¹P-NMR (d₆-DMSO): 0.94 (J(P,H) = 354 Hz, 3J(P,H-C(3')) = 8.1 Hz). Anal. berechnet für C₄₃H₅₆N₅O₉P (817.89): C 63.14, H 6.90, N 8.56; gefunden: C 63.06, H 6.88, N 8.51.

Beispiel 66:

2-Amino-7-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-(1-hexinyl)-3,7-dihydro-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (65)

Zu einer mit Argon durchspülten Lösung von Verbindung (58) (390 mg, 1 mmol in 5 ml getrocknetem DMF) werden Kupferiodid (38.1 mg, 0.2 mmol), Triethylamin (2.8 ml, 2 mmol), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (40.5 mg, 0.1 mmol) und 1-Hexin (492 mg, 6 mmol) hinzugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung eingedampft und auf eine Silicagelsäule (5 x 25 cm) gegeben. Nach schrittweiser Elution mit 5 %, 10 % und 20 % MeOH in CH₂Cl₂ erhält man Titelverbindung (65). Umkristallisation aus MeCN ergibt einen farblosen Feststoff (120 mg, 35 %). ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 0.94 (m, CH₃), 1.49, 2.38 (m, CH₂), 2.0 (M, H_α-C(2')), 2.35 (m, H_β-C(2')), 3.50 (m, H₂-C(5')), 3.76 (m, H-C(4')), 4. (m, H-C(3')), 4.88 (t, 5'-OH), 5.18 (d, J = 3.5, 3'-OH), 6.27 (m, H-C(1') + NH₂), 7.13 (s, H-C(6)), 10.34 (br., NH). MS: m/e 346 (M⁺).

Beispiel 67:

Festphasensynthese der Oligodesoxyribonucleotide nach der Phosphonat-Methode.

Die Oligodesoxyribonucleotidsynthesen wurden im 1 μmol Maßstab mittels der Phosphonat-Technik an einem automatisierten DNA-Synthesizer Modell 380 B (Applied Biosystems, Weiterstadt) an fester Phase (CPG: ®Controlled Pore

Glass), wobei das DNA-Fragment in 3'-5'-Richtung synthetisiert wurde, durchgeführt. Der Reaktionszyklus (Detritylierung, Kupplung, Cappen und Oxidation) folgte dabei einem für die Phosphonat-Chemie entwickeltem Programm [H. Köster, K. Kulikowsky, T. Liese, W. Heikens, V. Kohli, Tetrahedron 1981, 37, 363.]. Das basen- und an der 5'-Hydroxylgruppe Dmt geschützte Oligonucleotid wurde durch 25% wässrigem Ammoniak innerhalb von 30 min vom Träger abgespalten. Die Schutzgruppen an den Heterozyklen wurden im gleichen Medium innerhalb von 48h bei 60°C entfernt. Die Proben wurden unter Zugabe eines Tropfens Triethylamin (Vermeidung der vorzeitigen Abspaltung der 5'-OH Schutzgruppe) in einem Speed-Vac ®Konzentrator auf etwa 200 µl eingengt. Sie sind so bei -25°C einige Monate haltbar.

Beispiel 68:

Festphasensynthese der Oligodesoxyribonucleotide nach der Phosphoramidit-Methode.

Die Oligodesoxyribonucleotidsynthesen wurden im 1 µmol Maßstab mittels der Festphasen-Phosphoramidit-Technik an einem automatisierten DNA-Synthesizer Modell 380 B (Applied Biosystems, Weiterstadt) mit Hilfe von ®CPG (Controlled Pore Glass) oder ®Fractosil, das die erste Nucleosid-Einheit über das 3'-Ende gebunden hält, durchgeführt. Dabei wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Waschen mit Acetonitril abs.
2. Behandeln mit 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan
3. Waschen mit Acetonitril abs.
4. Kondensation mit 10 µmol 5'-O-Dimethoxytritylnucleosid-3'-phosphorigsäure-β-cyanoethylester-diisopropylamidit und 50 µmol Tetrazol in 0.3 ml Acetonitril abs.
5. Waschen mit Acetonitril
6. Capping mit 20 % Acetanhydrid in THF mit 40% Lutidin und 10 % Dimethylaminopyridin
7. Waschen mit Acetonitril
8. Oxidation mit Jod (1.3 gr in THF/Wasser/Pyridin; 70:20:5=v:v:v)

Die Schritte 1 bis 8, nachfolgend ein DNA-Reaktionszyklus genannt, wurden zum Aufbau des Oligonucleotids entsprechend der zu synthetisierenden Sequenz wiederholt, wobei in Schritt 4 jeweils das der Sequenz entsprechende 5'-O-Dimethoxytrityl(nucleobase)-3'-phosphorigsäure-β-cyanoethylester-diisopropylamidit eingesetzt wurde. Nach abgeschlossener Synthese erfolgt die Aufarbeitung wie in Beispiel 67 beschrieben.

Beispiel 69:

HPLC-Aufreinigung der tritylgeschützten sowie entschützten Oligonucleotide

Im ersten Reinigungsschritt wurden die DMT-geschützten Oligomere über HPLC an RP-18-Kieselgel aufgereinigt (Laufmittelsystem I, s.u.), bis zur Trockene eingedampft, mehrmals mit trockenem Methanol nachgedampft und anschließend unter Eiskühlung durch 10-minütiges Einwirken von 80%-iger Essigsäure detrityliert. Daraufhin wurde die Säure tropfenweise bei 0°C mit Triethylamin (1-2 ml) neutralisiert, bis fast zur Trockene eingengt und zweimal mit absolutem Methanol nachgedampft. Nach Aufnahme des Rückstands in 500 µl bidestilliertem Wasser wurden die vollständig entschützten Oligonucleotide erneut über RP-18-Kieselgel per HPLC aufgereinigt (Laufmittelsystem II, s.u.). Die vereinigten Hauptzonen wurden abgedampft, der Rückstand in 500 µl bidestilliertem Wasser gelöst und über eine kurze RP-18-Säule entsalzt (Laufmittelsystem III, s.u.). Nach Lyophilisierung im Speed-Vac-Konzentrator wurden die Oligonucleotide in 100 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei -25°C gelagert.

Es wurden folgende HPLC-Laufmittel verwendet:

- A: 0.1 M Triethylammoniumacetat pH 7.0/ 5%-ig an Acetonitril
- B: bidestilliertes Wasser
- C: Acetonitril
- D: Methanol/Wasser 3:2

Folgende Gradienten-Systeme bestehend aus den obigen Laufmitteln wurden eingesetzt:

- I: 3 min. 15% C in A, 7 min. 15-40% C in A, 5 min. 40% C in A, 5 min. 40-15% C in A
- II: 20 min. 0-20% C in A, 5 min. 20% C in A
- III: 100% A
- IV: 30 min. B, 10 min. D
- V: 12 min. 100% A, 8 min. 0-40% C in A, 5 min. 40-0% C in A

Folgende Retentionszeiten der Oligomere wurden beobachtet:
HPLC-Retentionszeiten der synthetisierten Oligonucleotide:

Oligomer (5'→3'-Richtung)	Retentionszeiten [min]	
	mit Trityl	ohne Trityl
d(A ₁₂)	11.6	15.5
d(T ₁₂)	11.5	13.7
d(c ⁷ A ₁₁ A)	12.3	15.3
d(Br ⁷ c ⁷ A ₁₁ A)	12.7	19.1
d(Me ⁷ c ⁷ A ₁₁ A)	12.2	18.1
d(A-T) ₆	13.5	20.1
d(c ⁷ A-T) ₆	13.6	20.5
d(Cl ⁷ c ⁷ A-T) ₆	12.8	19.9
d(Br ⁷ c ⁷ A-T) ₆	12.3	17.8
d(Me ⁷ c ⁷ A-T) ₆	12.6	17.9

Beispiel 70:

Charakterisierung der Oligodesoxyribonukleotide durch enzymatische Hydrolyse.

Die Oligonucleotide (je 0.5 A₂₆₀-Einheiten) werden in 0.1 M Tris-HCl-Puffer (pH = 8.3, 200 µl) gelöst und mit Schlangengift-Phosphodiesterase (3 µg) 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit alkalischer Phosphatase (3 µg) versetzt und weitere 30 min die Temperatur bei 37°C gehalten. Die entstehende Nucleosid-Mischung wird mit Hilfe der Reversed-Phase-HPLC (Laufmittelsystem V) UV-spektrophotometrisch analysiert. Basierend auf den Peakflächen und den Extinktionskoeffizienten der Nucleoside bei 260 nm (dA: 15400, dC: 7300, dG: 11700, dT: 8800, Brdc⁷A: 5300, Medc⁷A: 4900, Cldc⁷A: 6300) kann die Nucleosidzusammensetzung des entsprechenden Oligonucleotids quantifiziert werden.

Beispiel 71:

Bestimmung der Spalthypochromizität durch enzymatische Hydrolyse der Oligonucleotide

0.2 A₂₆₀-Einheiten des Oligonucleotids werden in 0.1 M Tris-HCl-Puffer (pH = 8.3, 200 µl) mit Schlangengift-Phosphodiesterase hydrolysiert. Aus der UV-Absorption bei 260 nm vor und nach der Spaltung läßt sich die Hypochromizität in % unter Berücksichtigung der Enzymabsorption nach folgender Gleichung berechnen:

$$H_{\text{enzym}} = [(\epsilon_{\text{monomer}} - \epsilon_{\text{polymer}}) \cdot (\epsilon_{\text{monomer}})^{-1}] \cdot 100\%$$

Beispiel 72:

UV- und CD-spektroskopische Bestimmung der T_m-Werte und Berechnung der thermodynamischen Daten.

Die Ermittlung der T_m-Werte der Oligomere erfolgte an einem Cary 1 UV-Vis Spektrophotometer (Varian, Melbourne, Australien). Die Temperatur wurde mit 0.5°C bzw. 1.0°C pro Minute linear variiert. Zur Untersuchung der Schmelztemperatur wurden Oligomerkonzentrationen zwischen 0.2-0.8 A₂₆₀-Einheiten in 1 ml 60 mM Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 7.5, 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂) verwendet. Die Einzelstrang-Konzentration betrug bei den Experimenten an den nicht selbstkomplementären Oligonucleotiden 0.2-0.6 OD. Die Schmelzhypochromizität in % ergibt sich aus der Absorptionsänderung vor und nach dem Aufschmelzen nach folgender Gleichung:

$$H_{\text{Schm.}} = [(A_e - A_t)A_e^{-1}] \times 100$$

Die Analyse der Schmelzkurven erfolgte mit einem Programm ausgehend von einem Zweizustandsmodell ("stacked/unstacked") entsprechend der Gleichung:

$$\ln K = \ln [(E^S - E)/(E^U - E)] = S/R - H/RT$$

mit E = Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge, S = "stacked" und U = "unstacked". Die temperaturabhängigen CD-Spektren wurden an einem Jasco 600 Spektropolarimeter mit temperierbarer Quarz-Küvette in einem Wellenlängenbereich von 200-350 nm aufgenommen. Die Temperaturerhöhung wurde in Intervallen von 5-10°C in einem Bereich von 5 - 80°C in Konzentrationen von 3 - 15 µM in 60 mM Na-Cacodylat-Puffer sowie bei 0.1 M, 1 und 4 M NaCl durchgeführt.

Beispiel 73:

T _m -Werte der Oligonucleotide ^a	
Oligomer	T _m [°C]
d(A ₁₂) · d(T ₁₂)	44 ^b
d(c ⁷ A ₁₁ A) · d(T ₁₂)	30 ^b
d(Br ⁷ c ⁷ A ₁₁ A) · d(T ₁₂)	53 ^b
d(Me ⁷ c ⁷ A ₁₁ A) · d(T ₁₂)	48 ^b
[d(A-T) ₆] ₂	33 ^c
[d(c ⁷ A-T) ₆] ₂	36 ^c
[d(Br ⁷ c ⁷ A-T) ₆] ₂	55 ^c
[d(Cl ⁷ c ⁷ A-T) ₆] ₂	59 ^c
[d(Me ⁷ c ⁷ A-T) ₆] ₂	41 ^c
[d(Hexinyl ⁷ c ⁷ A-T) ₆] ₂	50 ^d
[d(I ⁷ c ⁷ A-T) ₆] ₂	60 ^d
[d(G-C) ₄] ₂	60 ^d
[d(c ⁷ G-C) ₄] ₂	53 ^d
[d(Me ⁷ c ⁷ G-C) ₄] ₂	58 ^d
[d(I ⁷ c ⁷ G-C) ₄] ₂	70 ^d

^a) bestimmt in 1M NaCl mit 60mM Na-Cacodylat, 100 mM MgCl₂, pH 7.1

^b) Oligomerkonzentration: 7.5 µM Einzelstrang,

^c) Oligomerkonzentration: 15 µM Einzelstrang

^d) Oligomerkonzentration: 10 µM Einzelstrang

Beispiel 74:

Phosphodiester-Hydrolyse von selbstkomplementären Oligonucleotide mit der Endodesoxyribonuclease EcoRI

0.5 A₂₆₀-Einheiten des entsprechenden Oligonucleotids werden in 100 µl Puffer (bestehend aus 50 µM Tris-HCl-Puffer pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM Magnesiumchlorid und 1 mM Dithioerythrol) gelöst und mit Endodesoxyribonuclease EcoRI (high concentration, 5 µl = 250 Einheiten) versetzt. Anschließend wurde bei 37°C inkubiert und in Zeitabständen von 30 min. Proben von jeweils 10 µl Volumen entnommen und mit Hilfe der Reverse-Phase-HPLC analysiert (Laufmittelsystem II).

Beispiel 75:

Überprüfung auf Nuclease-Stabilität

10 nmol des zu untersuchenden Oligonucleotids werden in 450 µl 20%-igem fötalem Kälberserum in RPMI-Medium und 50 µl bidestilliertem Wasser gelöst und bei 37°C inkubiert. Dann werden sofort und nach 1, 2, 4, 7 und 24 Stunden 10 µl Proben für die Gelelektrophorese bzw. 20 µl Proben für die HPLC entnommen, zum Abbruch der Reaktion mit 5 µl bzw. 10 µl Formamid versetzt und 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Für die Gelelektrophorese werden die Proben auf ein 15% Polyacrylamid-Gel (2% BIS) aufgetragen und dieses bei etwa 3000 Voltstunden entwickelt. Die Banden werden durch die Silberfärbung sichtbar gemacht. Zur HPLC-Analyse werden die Proben auf eine Gen-Pak Fax HPLC Säule (Waters/Millipore) gespritzt und bei 1 ml/min mit 5 bis 50 % Puffer A in B chromatographiert (Puffer A: 10mM Natrium-dihydrogenphosphat, 0,1 M NaCl in Acetonitril/Wasser 1:4 (v:v) pH 6,8; Puffer B: wie A, jedoch 1,5 M NaCl).

Beispiel 76:

Testung auf antivirale Aktivität:

Die antivirale Aktivität der Prüfsubstanzen gegen verschiedene humanpathogene Herpesviren wird im Zellkultursystem untersucht. Für den Versuch werden Affinierzellen (Vero, 2x10⁵/ml) in serumhaltigem Dulbecco's MEM (5 % Fötales Kälberserum FCS) in 96-Napf-Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das serumhaltige Medium wird dann abgesaugt und die Zellen werden zweimal mit serumfreiem Dulbecco's MEM (-FCS) überspült. Die Testsubstanzen werden in H₂O auf eine Konzentration von 600 µM vorverdünnt und bei -18°C aufbewahrt. Für den Test erfolgen weitere Verdünnungsschritte in Dulbecco's Minimal Essential Medium (MEM). Je 100 µl der einzelnen Prüfsubstanzverdünnungen werden zusammen mit 100 µl serumfreiem Dulbecco's MEM (-FCS) zu den gespülten Zellen gegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ werden die Zellen mit Herpes simplex Virus Typ 1 (ATCC VR733, HSV-1 F-strain) oder mit Herpes simplex Virus Typ 2 (ATCC VR734, HSV-2 G-Strain) infiziert in Konzentrationen, bei denen der Zellrasen innerhalb von 3 Tagen vollkommen zerstört wird. Bei HSV-1 beträgt die Infektionsstärke 500 Plaque-bildende Einheiten (PFU) pro Napf, bei HSV-2 350 PFU/Napf. Die Versuchsansätze enthalten dann Prüfsubstanz in Konzentrationen von 80 µM bis 0,04 µM in MEM, ergänzt durch 100 U/ml Penicillin G und 100 mg/l Streptomycin. Alle Versuche werden als Doppelbestimmung durchgeführt mit Ausnahme der Kontrollen, die achtfach je Platte durchgeführt werden. Die Versuchsansätze werden 17 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Cytotoxizität der Prüfsubstanzen wird nach 20 h Gesamtkubationszeit durch mikroskopische Begutachtung der Zellkulturen bestimmt. Als Dosis tolerata maxima (DTM) wird die höchste Präparatkonzentration bezeichnet, die unter den genannten Versuchsbedingungen noch keine mikroskopisch erkennbaren Zellschädigungen hervorruft. Es erfolgt daraufhin die Zugabe von FCS auf eine Endkonzentration von 4 % mit weiterer Inkubation für 55 h bei 37°C und 5% CO₂. Die unbehandelten Infektionskontrollen zeigen dann einen kompletten cytopathischen Effekt (CPE). Nach mikroskopischer Begutachtung der Zellkulturen werden diese dann mit Neutralrot entsprechend dem Vitalfärbungsverfahren nach Finter (1966) angefärbt. Die antivirale Aktivität einer Testsubstanz wird definiert als minimale Hemmkonzentration (MHK), die benötigt wird, um 30-60 % der Zellen vor dem virusbedingten cytopathogenen Effekt zu schützen.

Abkürzungen:

Bz	Benzoyl
br.	breit
CD	Circular dichroismus
d	Duplett
DC	Dünnschichtchromatographie
dG	2'-Desoxyguanosin
dA	2'-Desoxyadenosin

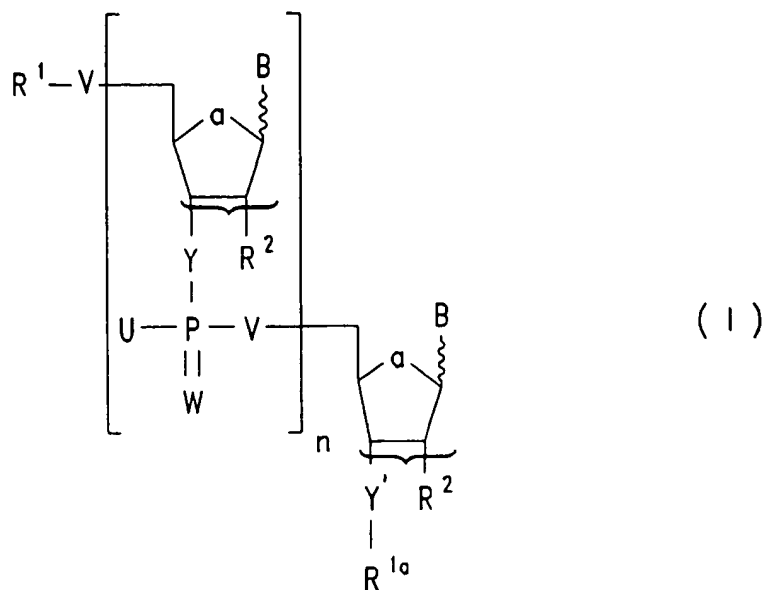
	dC	2'-Desoxycytidin
	dT	2'-Desoxythymidin
	(D ₆)DMSO	Dimethylsulfoxid, 6-fach deuteriert
	DMF	Dimethylformamid
5	DNA	Desoxyribonucleinsäure
	Dmt	4,4'-Dimethoxytrityl, (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	EtOAc	Ethylacetat
	Et ₃ N	Triethylamin
10	FC	Flashchromatographie
	G	Freie Enthalpie
	Gef.	gefunden
	getr.	getrocknet
	h	Stunde
15	H	Enthalpie der Duplexbildung
	HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
	Hyp.	Hypochromizität
	ibu	Isobuturyl
	J	Kopplungskonstante
20	K _m	Michaelis-Menten-Konstante
	NMR	Kernmagnetische Resonanz
	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
	PCR	Polymerase chain reaction
	ppm	parts per million
25	2-PrOH	Isopropanol
	R _f	Retention bei der DC relativ zur Laufmittelfront
	RNA	Ribonucleinsäure
	RP	Reverse-Phase
	s	Singulett
30	S	Entropie der Duplexbildung
	Smp.	Schmelzpunkt
	SVPD	Schlangengift-Phosphodiesterase
	t	Triplet
	TBK	Triethylammoniumbicarbonat
35	T _m	Schmelztemperatur bei Oligomeren
	UV	Ultraviolett
	v _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
	c ⁷ A	7-Desazaadenosin
	Br ⁷ c ⁷ A	7-Brom-7-Desazaadenosin
40	Cl ⁷ c ⁷ A	7-Chlor-7-Desazaadenosin
	I ⁷ c ⁷ A	7-Iod-7-Desazaadenosin
	Me ⁷ c ⁷ A	7-Methyl-7-Desazaadenosin
	c ⁷ G	7-Desazaguanosin
	I ⁷ c ⁷ G	7-Iod-7-Desazaguanosin
45	Me ⁷ c ⁷	7-Methyl-7-Desazaguanosin
	λ	Wellenlänge
	ε	molarer Extinktionskoeffizient

50

55

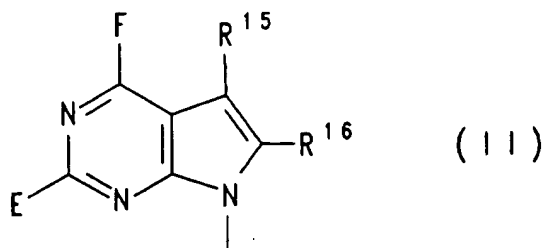
Patentansprüche

1. Oligonucleotid der Formel I



sowie dessen physiologisch verträglichen Salze worin

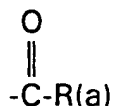
B unabhängig voneinander eine in der Nukleotidchemie übliche Base bedeutet und mindestens ein B eine Base der Formel II bedeutet



R¹⁵ und R¹⁶ worin unabhängig voneinander

- 45
1. Wasserstoff
 2. Halogen,
 3. (C₁-C₁₀)-Alkyl,
 4. (C₂-C₁₀)-Alkenyl,
 5. (C₂-C₁₀)-Alkynyl,
 6. NO₂,
 7. NH₂,
 8. Cyano,
 9. -S-(C₁-C₆)-Alkyl,
 10. (C₁-C₆)-Alkoxy
 11. (C₆-C₂₀)-Aryloxy
 12. SiH₃.
- 50
- 55

13.

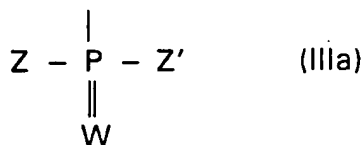


14. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, S-(C₁-C₆)-Alkyl, (C₁-C₆)-Alkoxy, OH, -NR(c)R(d), -CO-R(b), -NH-CO-NR(c)R(d), -NR(c)R(g), -NR(e)R(f), -NR(e)R(g) oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel

-[O-(CH₂)_r]-NR(c)R(d), wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1-18, bevorzugt 1-6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, -CO-R(b), -NH-CO-NR(c)R(d), -NR(c)R(d), -NR(e)R(f), -NR(e)R(g) oder -NR(c)R(g) zusätzlich mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder

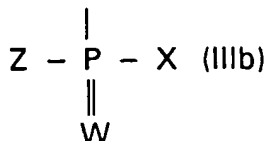
15. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, wobei ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet.

- R(a) OH, (C₁-C₆)-Alkoxy, (C₆-C₂₀)-Aryloxy, NH₂ oder NH-T bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft ist, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,
- R(b) Hydroxyl, (C₁-C₆)-Alkoxy, oder -NR(c)R(d) bedeutet,
- R(c) und R(d) unabhängig voneinander H, (C₁-C₆)-Alkyl unsubstituiert oder substituiert mit -NR(e)R(f) oder -NR(e)R(g) bedeuten,
- R(e) und R(f) unabhängig voneinander H oder (C₁-C₆)-Alkyl bedeuten,
- R(g) (C₁-C₆)-Alkyl-COOH bedeutet;
- mit der Maßgabe, daß R¹⁵ und R¹⁶ nicht jeweils gleichzeitig Wasserstoff, NO₂, NH₂, Cyano oder SiH₃ sein können;
- E und F unabhängig voneinander H, OH oder NH₂ bedeuten,
- R¹ Wasserstoff, C₁-C₁₈-Alkyl, C₂-C₁₈-Alkenyl, C₂-C₁₈-Alkyl, C₂-C₁₈-Alkylcarbonyl, C₃-C₁₉-Alkenylcarbonyl, C₃-C₁₉-Alkylcarbonyl, (C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₈)-alkyl, eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe oder einen Rest der Formel IIIa



bedeutet;

- R^{1a} Wasserstoff, C₁-C₁₈-Alkyl, C₂-C₁₈-Alkenyl, C₂-C₁₈-Alkyl, C₂-C₁₈-Alkylcarbonyl, C₃-C₁₉-Alkenylcarbonyl, C₃-C₁₉-Alkylcarbonyl, (C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₈)-alkyl, oder einen Rest der Formel IIIb



bedeutet;

R^2 Wasserstoff, Hydroxy, C_1 - C_{18} -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, Halogen, Azido oder NH_2 bedeutet;

a für Oxy, Sulfandiyl oder Methylen steht;

n eine ganze Zahl ≥ 1 bedeutet;

W Oxo, Thioxo oder Selenoxo bedeutet;

V Oxy, Sulfandiyl oder Imino bedeutet;

Y Oxy, Sulfandiyl, Imino oder Methylen bedeutet;

Y' Oxy, Sulfandiyl, Imino, $(\text{CH}_2)_m$ oder $\text{V}(\text{CH}_2)_m$ ist, worin

m eine ganze Zahl von 1 bis 18 bedeutet;

X Hydroxy oder Mercapto bedeutet;

U Hydroxy, Mercapto, SeH , C_1 - C_{18} -Alkoxy, C_1 - C_{18} -Alkyl, C_6 - C_{20} -Aryl, $(\text{C}_6$ - C_{14})-Aryl- $(\text{C}_1$ - C_8)-alkyl, NHR^3 , NR^3R^4 oder einen Rest der Formel IV



bedeutet, worin

R^3 C_1 - C_{18} -Alkyl, C_6 - C_{20} -Aryl, $(\text{C}_6$ - C_{14})-Aryl- $(\text{C}_1$ - C_8)-alkyl, $2-(\text{CH}_2)_c-[\text{NH}(\text{CH}_2)_d]\text{-NR}^6\text{R}^6$, worin c eine ganze Zahl von 2 bis 6 und d eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, und R^6 unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - C_6 -Alkyl oder C_1 - C_4 -Alkoxy- C_1 - C_6 -alkyl ist;

R^4 C_1 - C_{18} -Alkyl, C_6 - C_{20} -Aryl oder $(\text{C}_6$ - C_{10})-Aryl- $(\text{C}_1$ - C_8)-alkyl bedeutet oder im Falle von NR^3R^4 zusammen mit R^3 und dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen heterozyklischen Ring bedeutet, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann,

p eine ganze Zahl von 1 bis 100 ist,

q eine ganze Zahl von 0 bis 22 ist,

R^5 Wasserstoff oder eine funktionelle Gruppe wie beispielsweise Hydroxy, Amino, C_1 - C_{18} -Alkylamino, COOH , CONH_2 , $\text{COO}(\text{C}_1$ - C_4)-Alkyl oder Halogen bedeutet;

Z und Z' unabhängig voneinander

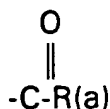
Hydroxy, Mercapto, SeH , C_1 - C_{22} -Alkoxy, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_b\text{-NR}^6\text{R}^7$, worin b eine ganze Zahl von 1 bis 6 ist, und R^7 C_1 - C_6 -Alkyl ist oder R^6 und R^7 zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 3-6 gliedrigen Ring bilden, C_1 - C_{18} -Alkyl, C_6 - C_{20} -Aryl, $(\text{C}_6$ - C_{14})-Aryl- $(\text{C}_1$ - C_8)-alkyl, $(\text{C}_6$ - C_{14})-Aryl- $(\text{C}_1$ - C_8)-alkoxy, wobei Aryl auch Heteroaryl bedeutet und Aryl gegebenenfalls durch 1, 2 oder 3 gleiche oder verschiedene Reste aus der Reihe Carboxy, Amino, Nitro, C_1 - C_4 -Alkylamino, C_1 - C_6 -Alkoxy, Hydroxy, Halogen und Cyano substituiert ist, C_1 - C_{18} -Alkylmercapto, NHR^3 , NR^3R^4 , einen Rest der Formel IV oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigt oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift, und

die geschweifte Klammer andeutet, daß sich R^2 und der benachbarte Phosphoryl-Rest bzw. $-\text{Y}'\text{-R}^{1a}$ -Rest in 2'- und 3'-Stellung oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-Stellung befinden können, wobei jedes Nucleotid in seiner D- bzw. L-Konfiguration vorliegen kann und sich die Base B in α - bzw. β -Stellung befinden kann.

2. Oligonucleotid gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

- R^{15} 1. NO_2 ,
2. NH_2 ,
3. $-\text{S}-(\text{C}_1$ - $\text{C}_6)$ -Alkyl,

4. (C₁-C₆)-Alkoxy
5. (C₆-C₂₀)-Aryloxy
6. SiH₃.
- 7.



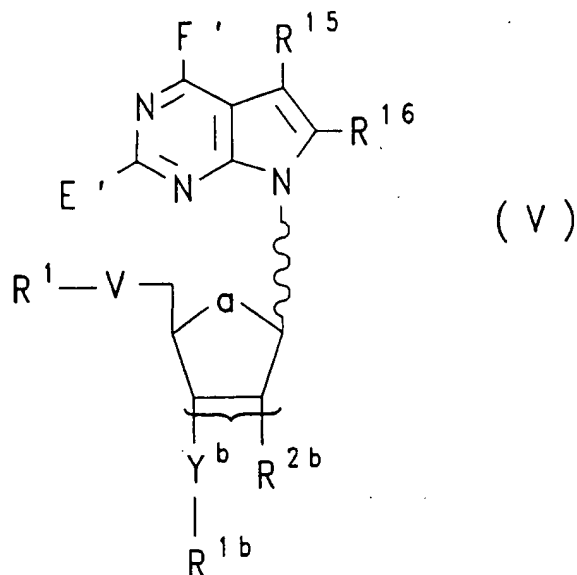
8. (C₁-C₁₀)-Alkyl, (C₂-C₁₀)-Alkenyl oder (C₂-C₁₀)-Alkynyl, das mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, S-(C₁-C₆)-Alkyl, (C₁-C₆)-Alkoxy, OH, -NR(c)R(d), -CO-R(b), -NH-CO-NR(c)R(d), -NR(c)R(g), -NR(e)R(f), -NR(e)R(g) oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel -[O-(CH₂)_r]_s-NR(c)R(d), wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1-18, bevorzugt 1-6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, -CO-R(b), -NH-CO-NR(c)R(d), -NR(c)R(d), -NR(e)R(f), -NR(e)R(g) oder -NR(c)R(g) zusätzlich mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA-oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogons an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder
9. (C₁-C₁₀)-Alkyl, (C₂-C₁₀)-Alkenyl oder (C₂-C₁₀)-Alkynyl, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet; und

R¹⁶ Wasserstoff ist.

3. Oligonucleotid gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Base B in β-Stellung befindet, die Nucleotide in der D-Konfiguration vorliegen, R² sich in 2'-Stellung befindet, a für Oxy steht und n eine ganze Zahl von 2 - 99 bedeutet.
4. Oligonucleotid gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß

R ¹	Wasserstoff, C ₁ -C ₆ -Alkyl, insbesondere Methyl, oder einen Rest der Formel IIIa bedeutet;
R ^{1a}	Wasserstoff, C ₁ -C ₆ -Alkyl, insbesondere Methyl, oder einen Rest der Formel IIIb bedeutet;
R ²	Wasserstoff, C ₁ -C ₆ -Alkoxy, C ₁ -C ₆ -Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, oder Hydroxy, insbesondere Wasserstoff, bedeutet;
n	eine ganze Zahl von 4 bis 39, insbesondere 5 bis 29, bedeutet;
m	eine ganze Zahl von 1 bis 6, insbesondere 1, bedeutet;
U	Hydroxy, Mercapto, C ₁ -C ₆ -Alkoxy, C ₁ -C ₆ -Alkyl, NR ³ R ⁴ oder NHR ³ , insbesondere Hydroxy oder C ₁ -C ₆ -Alkyl, bedeutet, worin
R ³	C ₁ -C ₈ -Alkyl, bevorzugt C ₁ -C ₄ -Alkyl, oder Methoxyethyl ist, und B, W, V, Y, Y', X und Z die in Anspruch 1 aufgeführte Bedeutung haben.
5. Oligonucleotid gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß V, Y und Y' die Bedeutung von Oxy, Sulfandiyl oder Imino haben und W die Bedeutung von Oxo oder Thioxo hat.
6. Oligonucleotid gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß U die Bedeutung von Hydroxy, Methyl oder Mercapto hat.
7. Oligonucleotid gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß R¹ und/oder R^{1a} für Wasserstoff steht.
8. Verfahren zur Herstellung der Oligonucleotide der Formel I sowie dessen physiologisch verträglichen Salze nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß man sukzessive ein Nucleotid mit jeweils einer Nucleobase an einen entsprechenden derivatisierten Träger oder an eine wachsende Oligomerkette ankondensiert.

9. Verwendung der Oligonucleotide nach einem der Ansprüche 1-7 zur Herstellung eines Arzneimittels oder Diagnostikums.
10. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels oder Diagnostikums, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Oligonucleotid nach einem der Ansprüche 1-7 mit einem physiologisch annehmbaren Träger sowie gegebenenfalls geeigneten Zusatzstoffen und/oder Hilfsstoffen vermischt wird.
11. Arzneimittel oder Diagnostikum, enthaltend eine oder mehrere der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1-7, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch annehmbaren Träger und/oder Hilfsstoffen.
12. Nucleotidmonomer der Formel V



worin

V Oxy, Sulfandiyl oder Imino ist;

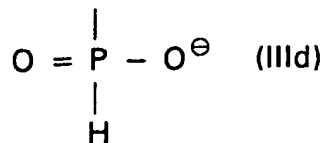
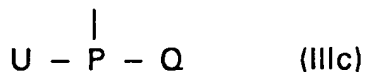
Y^b Oxy, Sulfandiyl oder Methylen ist;

a für Oxy, Sulfandiyl oder Methylen steht;

R^{2b} Wasserstoff, OR¹², C₁-C₁₈-Alkoxy, C₁-C₆-Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, Halogen, Azido oder NR¹⁰R¹¹ bedeutet;

R¹ eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe bedeutet;

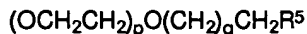
R^{1b} ein Succinylrest ist, der über eine Amid- oder Methylimidbindung mit einem amino- oder methylaminofunktionalisierten Träger verknüpft ist, oder einen Rest der Formel IIIc oder IIIId bedeutet



worin

U

(C₁-C₁₈)-Alkoxy, (C₁-C₁₈)-Alkyl, (C₆-C₂₀)-Aryl, (C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₈)-Alkyl, O-R⁷, S-R⁷ oder einen Rest der Formel IV



(IV)

Q

worin R⁵ gleich H ist, bedeutet;

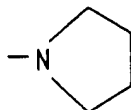
R⁷

einen Rest -NR⁸R⁹ bedeutet

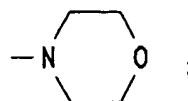
R⁸ und R⁹

-(CH₂)₂-CN bedeutet;

gleich oder verschieden sind und C₁-C₆-Alkyl, insbesondere Isopropyl oder Ethyl bedeuten oder zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-9-gliedrigen heterozyklischen Ring bedeuten, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann, insbesondere



o d e r



E' und F'

R¹⁰ und R¹¹

unabhängig voneinander H, OR¹² oder NR¹⁰R¹¹ bedeuten,

gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine in der Nukleotidchemie übliche Aminoschutzgruppe bedeuten oder R¹⁰ und R¹¹ gemeinsam eine in der Nukleotidchemie übliche Aminoschutzgruppe bilden;

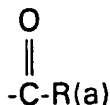
R¹²

Wasserstoff oder eine in der Nukleotidchemie übliche Hydroxylschutzgruppe, wie beispielsweise t-Butyl-dimethyl-silyl, Triisopropyl-silyl, o-nitro-Benzyl, p-nitro-Benzyl oder 2-Fluorphenyl-4-methoxypiperidin-4-yl (FPMP) bedeutet;

R¹⁵ und R¹⁶

unabhängig voneinander

1. Wasserstoff
2. Halogen,
3. (C₁-C₁₀)-Alkyl,
4. (C₂-C₁₀)-Alkenyl,
5. (C₂-C₁₀)-Alkynyl,
6. NO₂,
7. NH₂,
8. Cyano,
9. -S-(C₁-C₆)-Alkyl,
10. (C₁-C₆)-Alkoxy
11. (C₆-C₂₀)-Aryloxy
12. SiH₃,
- 13.



14. einen wie unter 3., 4., oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, S-(C₁-C₆)-Alkyl, (C₁-C₆)-Alkoxy, OH, -NR(c)R(d), -CO-R(b), -NH-CO-NR(c)R(d), -NR(c)R(g), -NR(e)R(f), -NR(e)R(g) oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel

-[O-(CH₂)_r]_s-NR(c)R(d), wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1-18, bevorzugt 1-6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, -CO-R(b), -NH-CO-NR(c)R(d), -NR(c)R(d), -NR(e)R(f), -NR(e)R(g) oder -

NR(c)R(g) eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe tragen oder mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder
 15. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet,

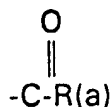
- R(a) OH, (C₁-C₆)-Alkoxy, (C₆-C₂₀)-Aryloxy, NH₂ oder NH-T bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sind, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,
- R(b) Hydroxyl, (C₁-C₆)-Alkoxy, oder -NR(c)R(d) bedeutet,
- R(c) und R(d) unabhängig voneinander H, (C₁-C₆)-Alkyl unsubstituiert oder substituiert mit -NR(e)R(f) oder -NR(e)R(g) bedeuten,
- R(e) und R(f) unabhängig voneinander H oder (C₁-C₆)-Alkyl bedeuten,
- R(g) (C₁-C₆)-Alkyl-COOH bedeutet;
- mit der Maßgabe, daß R¹⁵ und R¹⁶ nicht jeweils gleichzeitig Wasserstoff, NO₂, NH₂, Cyano oder SiH₃ sein können;

wobei funktionelle Gruppen wie OH, NH₂ oder COOH gegebenenfalls mit einer in der Nukleotidchemie üblichen Gruppe geschützt sind,

die geschweifte Klammer andeutet, daß sich R^{2b} und der benachbarte -Y^b-R^{1b}-Rest in 2'- und 3'-Stellung oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-Stellung befinden können.

13. Nukleotidmonomer der Formel V gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß

- R¹⁵ 1. NO₂,
 2. NH₂,
 3. -S-(C₁-C₆)-Alkyl,
 4. (C₁-C₆)-Alkoxy
 5. (C₆-C₂₀)-Aryloxy
 6. SiH₃,
 7.



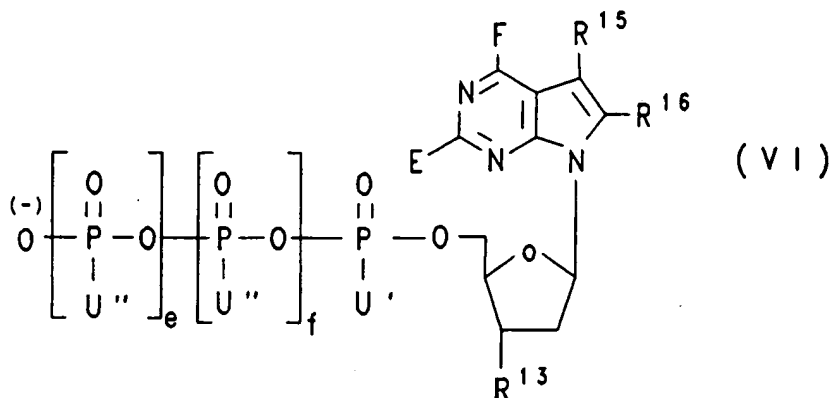
8. (C₁-C₁₀)-Alkyl, (C₂-C₁₀)-Alkenyl oder (C₂-C₁₀)-Alkynyl, das mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, S-(C₁-C₆)-Alkyl, (C₁-C₆)-Alkoxy, OH, -NR(c)R(d), -CO-R(b), -NH-CO-NR(c)R(d), -NR(c)R(g), -NR(e)R(f), -NR(e)R(g) oder mit einem Polyalkylenglykol-Rest der Formel -[O-(CH₂)_r]_s-NR(c)R(d), wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1-18, bevorzugt 1-6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, -CO-R(b), -NH-CO-NR(c)R(d), -NR(c)R(d), -NR(e)R(f), -NR(e)R(g) oder -NR(c)R(g) zusätzlich mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder
9. (C₁-C₁₀)-Alkyl, (C₂-C₁₀)-Alkenyl oder (C₂-C₁₀)-Alkynyl, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet; und

R¹⁶ Wasserstoff ist.

14. Verfahren zur Herstellung eines Nucleotidmonomers der Formel V gemäß Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die korrespondierenden Nucleosidmonomere der Formel V nach Einführung geeigneter Aminoschutzgruppen bzw. Hydroxylschutzgruppen in die entsprechenden Phosphonat- oder Phosphoramiditderivate übergeführt werden.

15. Verwendung eines Nucleotidmonomers gemäß Anspruch 12 oder 13 zur Herstellung von Oligonukleotiden, die zusammen mit ihren Target-Nucleinsäuren stabile Hybridisierungskomplexe bilden.

16. Verbindung der Formel VI



worin unabhängig voneinander

$U' = U'' = U'''$

e und f

R^{13}

E und F

R^{15} und R^{16}

gleich Hydroxyl oder Mercapto ist;

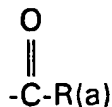
0 oder 1 bedeuten;

Wasserstoff, OH, C_1 - C_{18} -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, bedeutet;

unabhängig voneinander H, OH oder NH_2 bedeuten;

unabhängig voneinander

1. Wasserstoff
2. Halogen,
3. (C_1-C_{10}) -Alkyl,
4. (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
5. (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
6. NO_2 ,
7. NH_2 ,
8. Cyano,
9. $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl,
10. (C_1-C_6) -Alkoxy
11. (C_6-C_{20}) -Aryloxy
12. SiH_3 ,
- 13.



14. einen wie unter 3., 4., oder 5. definierten Rest, der mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe SH, $S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, (C_1-C_6) -Alkoxy, OH, $-NR(c)R(d)$, $-CO-R(b)$, $-NH-CO-NR(c)R(d)$, $-NR(c)R(g)$, $-NR(e)R(f)$, $-NR(e)R(g)$ oder mit einem Polyalkylenglykol-

Rest der Formel

$-\text{O}-(\text{CH}_2)_r-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{d})$, wobei r und s unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1-18, bevorzugt 1-6, bedeuten, substituiert ist wobei funktionelle Gruppen wie OH, SH, $-\text{CO}-\text{R}(\text{b})$, $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{d})$, $-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{d})$, $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{f})$, $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{g})$ oder $-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{g})$ zusätzlich mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft sein können, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen, oder

15. einen wie unter 3., 4. oder 5. definierten Rest, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeutet,

$\text{R}(\text{a})$ OH, (C_1-C_6) -Alkoxy, $(\text{C}_6-\text{C}_{20})$ -Aryloxy, NH_2 oder $\text{NH}-\text{T}$ bedeutet, wobei T eine Alkylcarboxy- oder Alkylaminogruppe darstellt, die mit einer oder mehreren Gruppen, gegebenenfalls über einen weiteren Linker, verknüpft ist, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen oder als Markierung einer DNA- oder RNA-Sonde dienen oder bei der Hybridisierung des Oligonucleotidanalogs an die Target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen,

$\text{R}(\text{b})$ Hydroxyl, (C_1-C_6) -Alkoxy, oder $-\text{N}(\text{R}(\text{c})\text{R}(\text{d}))$ bedeutet,

$\text{R}(\text{c})$ und $\text{R}(\text{d})$ unabhängig voneinander H, (C_1-C_6) -Alkyl unsubstituiert oder substituiert mit $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{f})$ oder $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{g})$ bedeuten,

$\text{R}(\text{e})$ und $\text{R}(\text{f})$ unabhängig voneinander H oder (C_1-C_6) -Alkyl bedeuten,

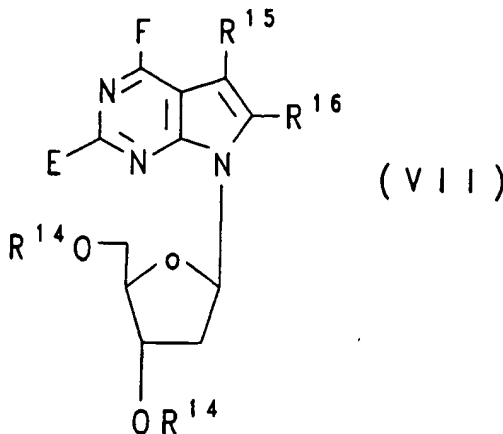
$\text{R}(\text{g})$ (C_1-C_6) -Alkyl-COOH bedeutet

mit der Maßgabe, daß R^{15} und R^{16} nicht jeweils gleichzeitig Wasserstoff, NO_2 , NH_2 , Cyano oder SiH_3 sein können,

wobei Verbindungen der Formel VI ausgenommen sind in denen R^{16} gleich H ist und R^{15} $(\text{C}_2-\text{C}_{10})$ -Alkynyl, substituiert mit $-\text{NR}(\text{c})\text{R}(\text{d})$ oder $-\text{NR}(\text{e})\text{R}(\text{f})$ bedeutet; und der weiteren Maßgabe, daß e und f nicht 0 sind, wenn $\text{E} = \text{OH}$ oder NH_2 und $\text{F} = \text{OH}$ ist, R^{16} Wasserstoff ist und R^{15} Br, Cl, F, Cyano, (C_1-C_4) -Alkyl, (C_2-C_4) -Alkenyl oder (C_2-C_4) -Alkynyl bedeutet.

17. Verwendung eines Nucleotidmonomers der Formel VI gemäß Anspruch 16 als Hilfsmittel in der Molekularbiologie.

18. Verbindung der allgemeinen Formel VII



worin

E und F unabhängig voneinander H, OH oder NH_2 bedeuten und OH und NH_2 gegebenenfalls mit einer in der Nukleotidchemie üblichen Schutzgruppe geschützt sind;

R^{15} und R^{16} unabhängig voneinander Wasserstoff, $(\text{C}_1-\text{C}_{10})$ -Alkyl, $(\text{C}_2-\text{C}_{10})$ -Alkenyl, $(\text{C}_2-\text{C}_{10})$ -Alkynyl, J, Cl, Br, F, Cyano oder $(\text{C}_1-\text{C}_{10})$ -Alkyl, $(\text{C}_2-\text{C}_{10})$ -Alkenyl oder $(\text{C}_2-\text{C}_{10})$ -Alkynyl, worin ein bis alle H-Atome durch Halogen, vorzugsweise Fluor, substituiert sind, bedeuten,

wobei R^{15} und R^{16} nicht gleichzeitig Wasserstoff und Cyano sein können, und der weiteren Maßgabe, daß R^{15} nicht J ist, wenn R^{16} Wasserstoff, E NH_2 und F OH bedeutet, unabhängig voneinander H oder eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe bedeutet.

R^{14}

- 5
19. Verwendung von 7-Desazapurinnukleotiden, die an der 7- und/oder 8-Position substituiert sind, zur Sequenzierung von Nukleinsäuren.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55